



熱殺菌バリデーションの理論と実践

バリデーションとは何か

定義

製造設備や分析機器が適切な環境のもと正しく動作し、仕様に沿った水準に維持されているかを検証することです。

現状の課題

日本のホットパック・中間水分食品・レトルト・アセプティックラインのすべてで、バリデーションという概念が不在のまま生産開始されることが当たり前になっています。

HACCPで強調されるように、熱殺菌というCCPが正常に機能していることを保証するには多岐にわたるエビデンスの入手が必須であり、そのためにバリデーションは不可欠です。



熱殺菌の基本

熱殺菌の効果は、対象食品のpHと水分活性（Aw）によって大きく左右されます。これらの値に応じて、要求される殺菌価の種類と水準が異なります。

殺菌価の要求水準と法規制

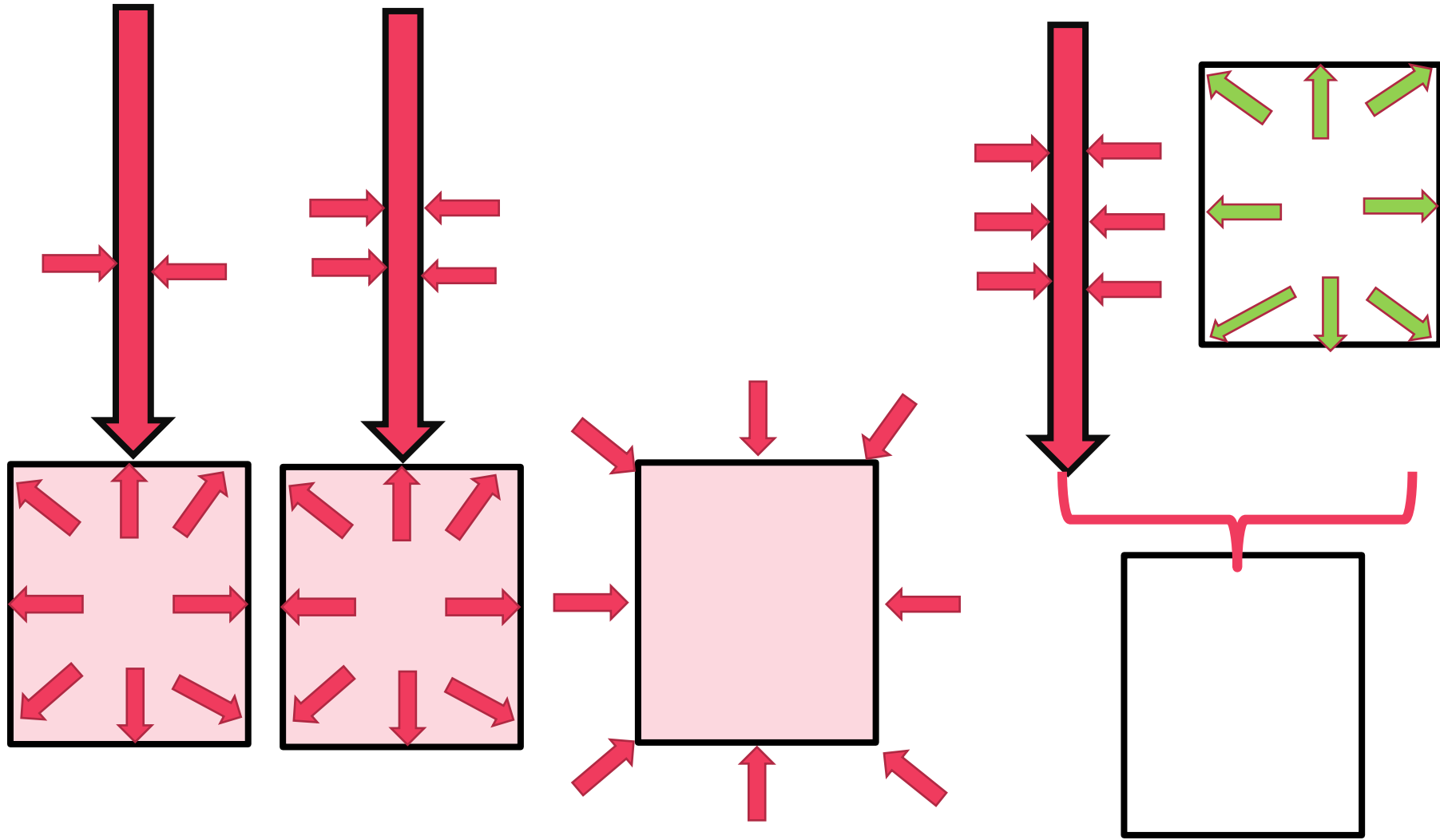
食品衛生法の範囲

食品衛生法が要求する殺菌価は、主に食中毒菌を対象としています。しかし、より強い耐熱性をもつ変敗菌はその対象に含まれていません。

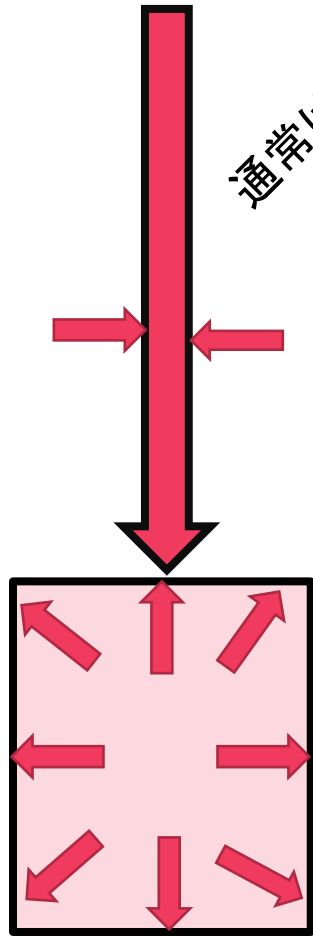
実務上の重要ポイント

法規制を満たすだけでは不十分な場合が多いです。変敗菌による品質劣化リスクを考慮した、より高い水準のバリデーション設計が求められます。

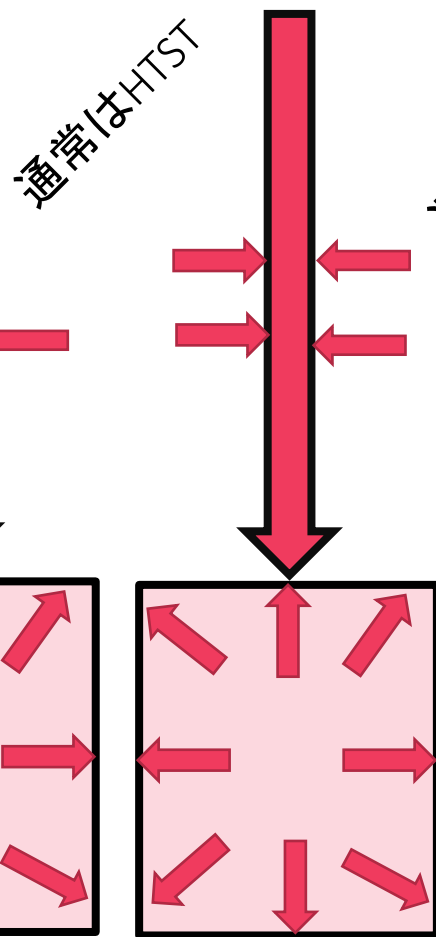
⚠ 食中毒菌への対応だけでなく、変敗菌まで含めた殺菌設計が製品品質の確保に不可欠です。



熱のかけ方と容器の殺菌

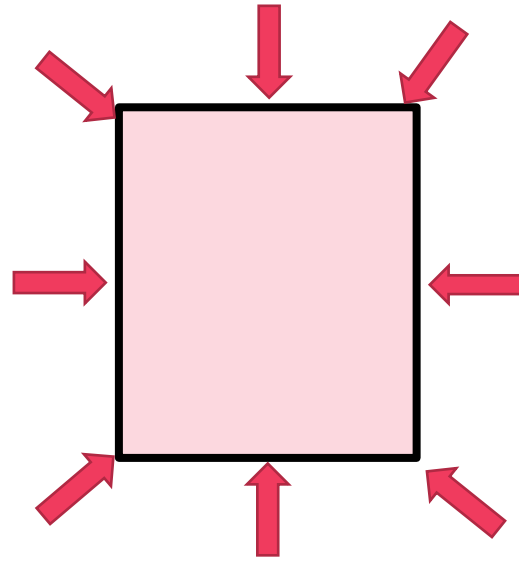


ホットパック

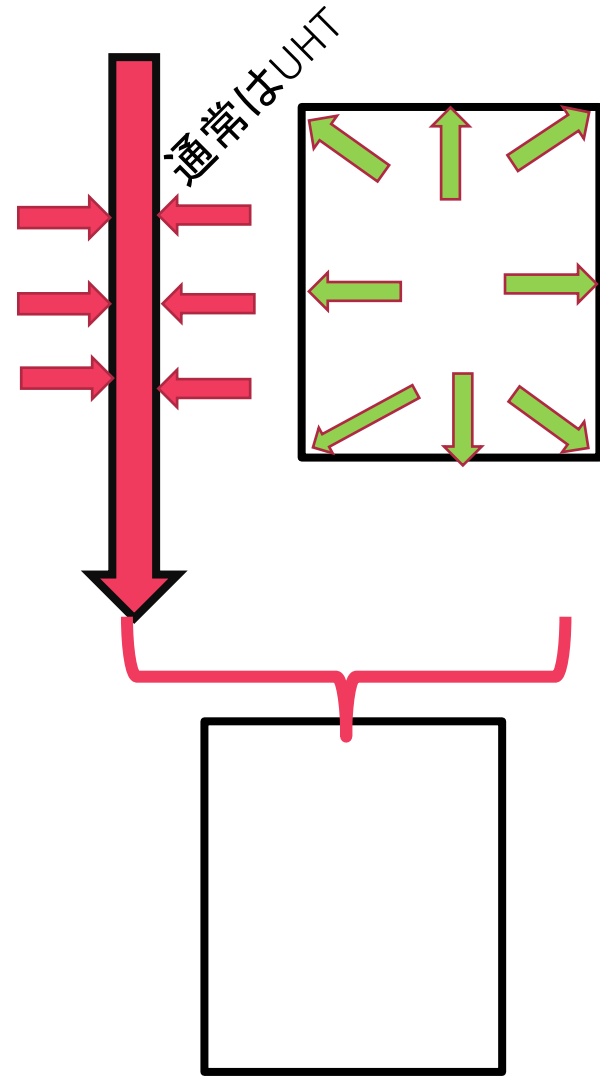


前殺菌+ホット
パック

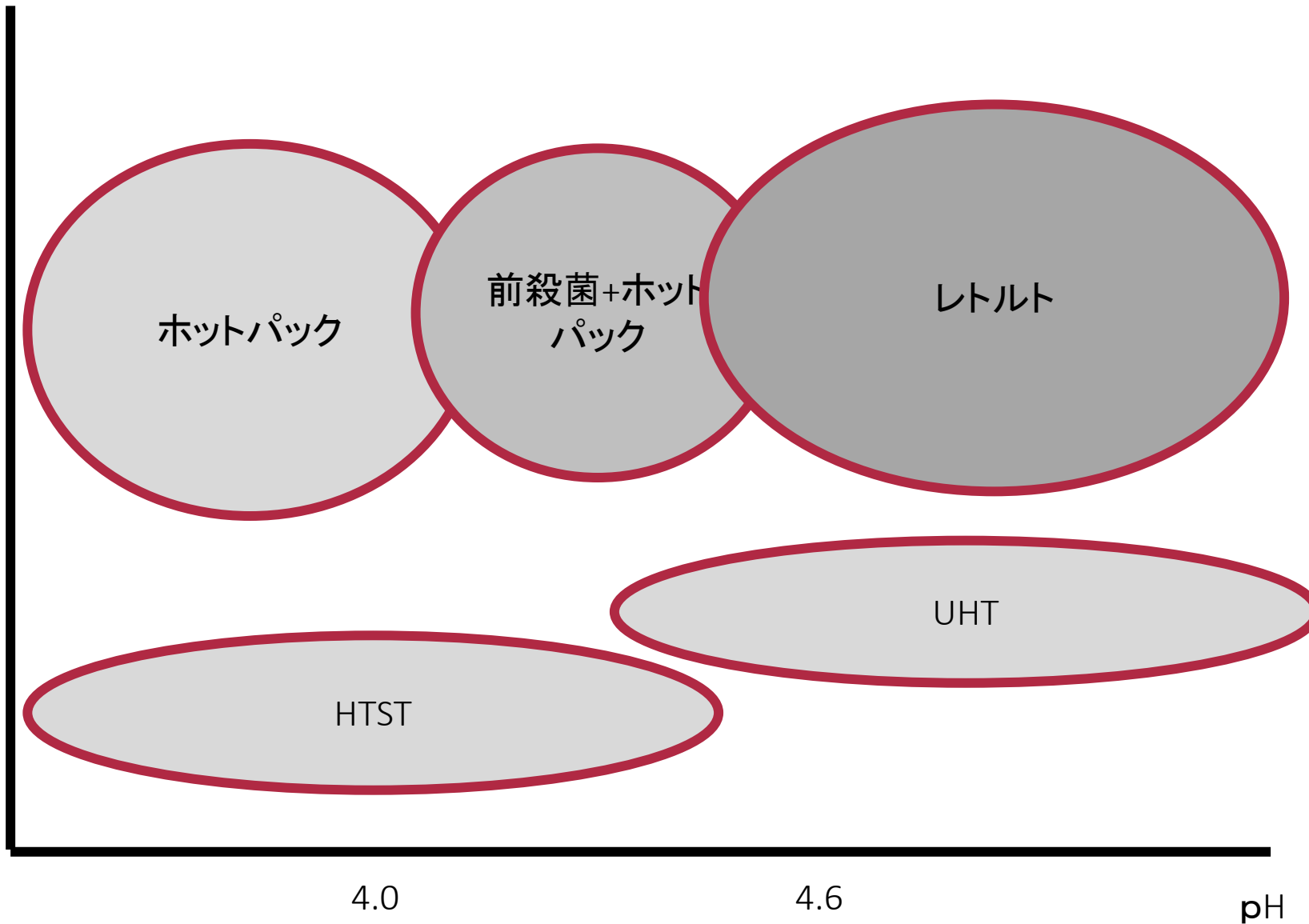
通常はHTST



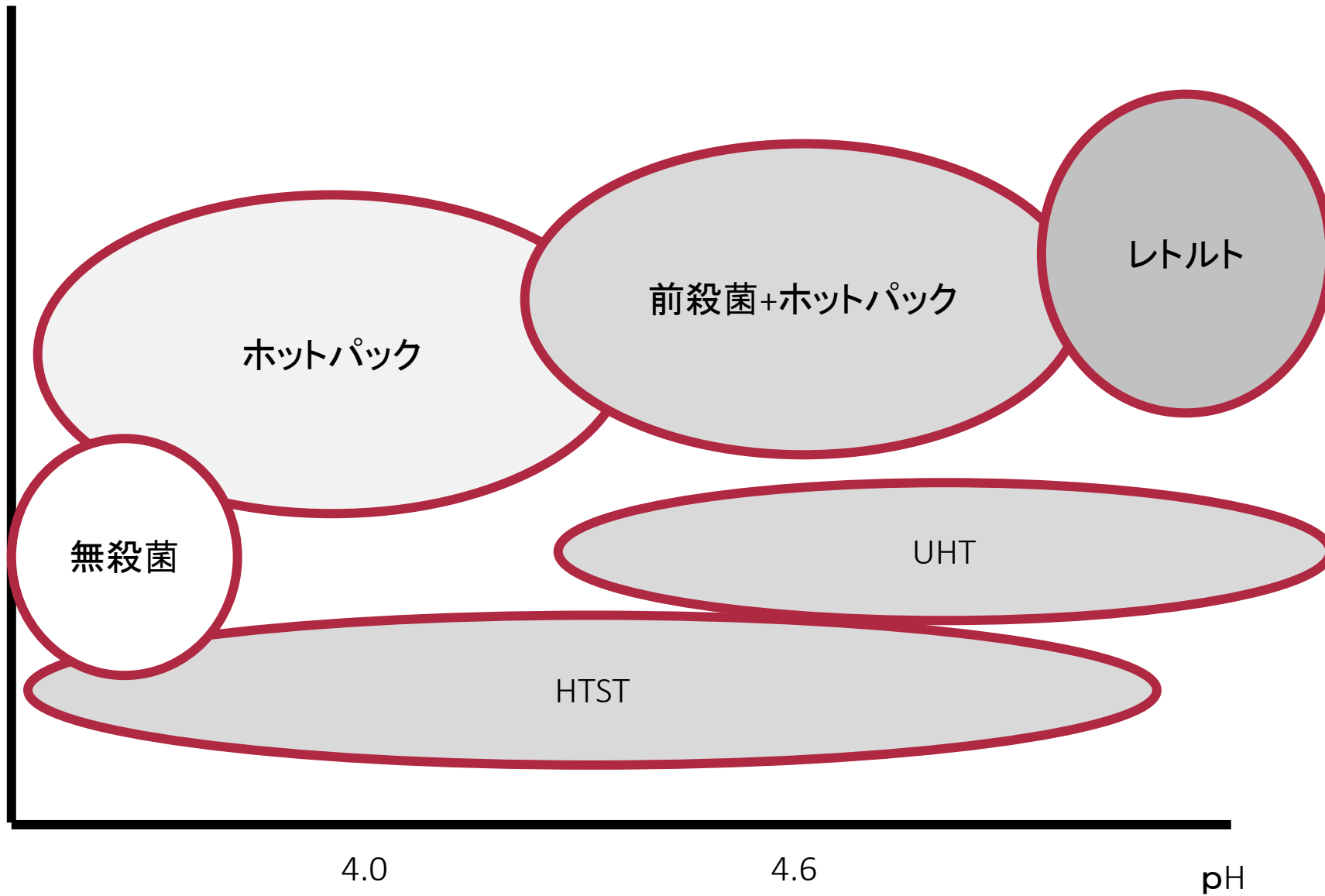
通常はレトルト



アセティック



水分活性 > 0.94 、常温保存品



水分活性 > 0.94 、要冷蔵品

食品安全危害要因のいろいろ

発現しうる危害要因の重篤度に応じて、バリデーションに求められる水準が変わります。製造方式ごとに想定される危害要因の特徴を正確に把握することが出発点です。



製造方式別の攪乱要因の特徴

ホットパック

加熱後に充填・密封。充填温度の維持管理が鍵。再汚染リスクと容器内温度分布が主な攪乱要因。

中間水分食品

水分活性を低下させて保存性を確保。耐乾燥性菌・カビ・酵母が主な危害要因となりうる。

レトルト

密封後に加圧加熱殺菌。ボツリヌス菌を含む芽胞形成菌が最重要危害要因。

アセプティック

製品と容器を別々に殺菌後、無菌環境で充填。装置の無菌性維持が最大の課題。

バリデーシヨンの分野

2つの領域

熱殺菌バリデーシヨンは、①菌自体の殺滅データに関するバリデーシヨンと、②装置・製品に関するバリデーシヨンの2領域に分けられます。

それぞれが独立して機能するのではなく、両者を組み合わせて初めて、製造プロセス全体の安全性が保証されます。

菌の耐熱性の差異

D値

特定温度において菌数を90%減少させるのに要する時間。対象菌株ごとに実験的に求めます。

Z値

D値を1/10にするために必要な温度変化量。温度と殺菌効果の関係を定量化します。

F値の算出

D値・Z値をもとに、実際の加熱プロセスの殺菌効果を積算した値。バリデーションの主要指標です。

装置・製品でのバリデーシヨン



温度分布試験

充填機およびそれ以降のラインの温度分布を測定し、コールドスポットを特定します。



保持時間の確認

規定温度での保持時間が製品全体にわたって確保されているかを検証します。



容器内温度分布・殺菌剤濃度分布

充填後の容器内部における殺菌効果の均一性を確認、殺菌不足箇所がないことを保証します。 ← 現実には不可能なことが多い



再汚染防止の確認：密封前、密封後の汚染防止

充填・密封工程での二次汚染リスクを評価し、衛生管理の有効性を検証します。

い



バリデーション結果をオーバーラ イトしうるもの

バリデーションを適切に実施しても、その後の変化によって無効化される場合があります。以下の4つの要因が特に重要です。

微生物の耐熱性の分化とバイオフィルム

微生物の耐熱性の分化

同一菌種でも、継代培養や環境ストレスへの適応により耐熱性が変化することがあります。バリデーション時に使用した菌株の耐熱性が、実際の汚染菌とは異なる可能性があります。

野生株の恐ろしさ

バイオフィルム

装置内面に形成されたバイオフィルム内の菌は、通常の浮遊菌と比べて著しく高い耐熱性・耐薬品性を示します。定期的な洗浄・殺菌の有効性確認が不可欠です。

バイオフィルムの恐ろしさ

バイオフィルム (biofilm) これまでの微生物細胞の耐性度合は研究室で使用する培地で培養した浮遊細胞を用いて検証している。しかしながら、実際に微生物が生育している環境を観察すると細胞が単独で生育している場合は比較的少なく、固形物表面に付着して集団を形成していることが多い。このような集団をバイオフィルムと呼ぶ。バイオフィルムでは、微生物細胞のみが密接に接着しているのではなく、菌体外多糖や核酸、タンパク質なども絡み合ったネットワーク構造を形成し、細胞単独で存在している浮遊細胞に比べて環境ストレスや抗生物質に対して耐性が非常に高いことが知られている¹⁰⁾。

装置の劣化とヒューマンエラー

装置側の構造・性能の劣化

熱交換器の汚れ・配管の腐食・センサーの経年劣化などにより、バリデーション時と同等の性能が維持されなくなります。定期的な性能確認（再バリデーション）が必要です。

ミスオペレーション（ヒューマンエラー）

設定温度の入力ミス・バルブの操作誤り・記録の見落としなど、人的ミスはバリデーション結果を実質的に無効にします。手順書の整備とトレーニングが重要です。

⊗ これら4要因のいずれかが発生した場合、バリデーション結果の有効性を再評価する必要があります。

そして どのケースでも起きうる
未殺菌製品の殺菌済み製品への混入

バリデーションデータをその後どう生かすか

バリデーションは「一度実施して終わり」ではありません。得られた結果をPDCAサイクルに乗せ、継続的な品質改善と安全確保に活用することが重要です。



PDCAプロセスへの組み込み

Plan（計画）

バリデーション計画の策定。対象菌・測定箇所・合否基準（許容水準）を設定します。

Act（改善）

不適合があった場合にはただちに付与条件を修正し、次のバリデーションにはいります。そうでなければ決定済みの次回バリデーションのタイミングに実施。



Do（実施）

温度分布試験・耐熱性試験・微生物試験を実施し、データを記録します。

Check（評価）

結果を基準と照合し、殺菌プロセスの有効性を評価・記録します。次回バリデーションのタイミングを事前に決定しておきます。次回バリデーションのタイミングを早めかねない因子があれば そのモニタリング方法を決めておきます。再バリデーションの必要な変更課目についても合意しておきます

再バリデーションが必要となる事態の例

→ 製品処方・原材料の変更

pH・水分活性・粘度などが変わると、熱伝達・殺菌特性が変化し既存のバリデーション結果が適用できなくなることがあります。

→ 製造条件の変更

充填温度・充填量・ライン速度の変更は殺菌効果に直結します。

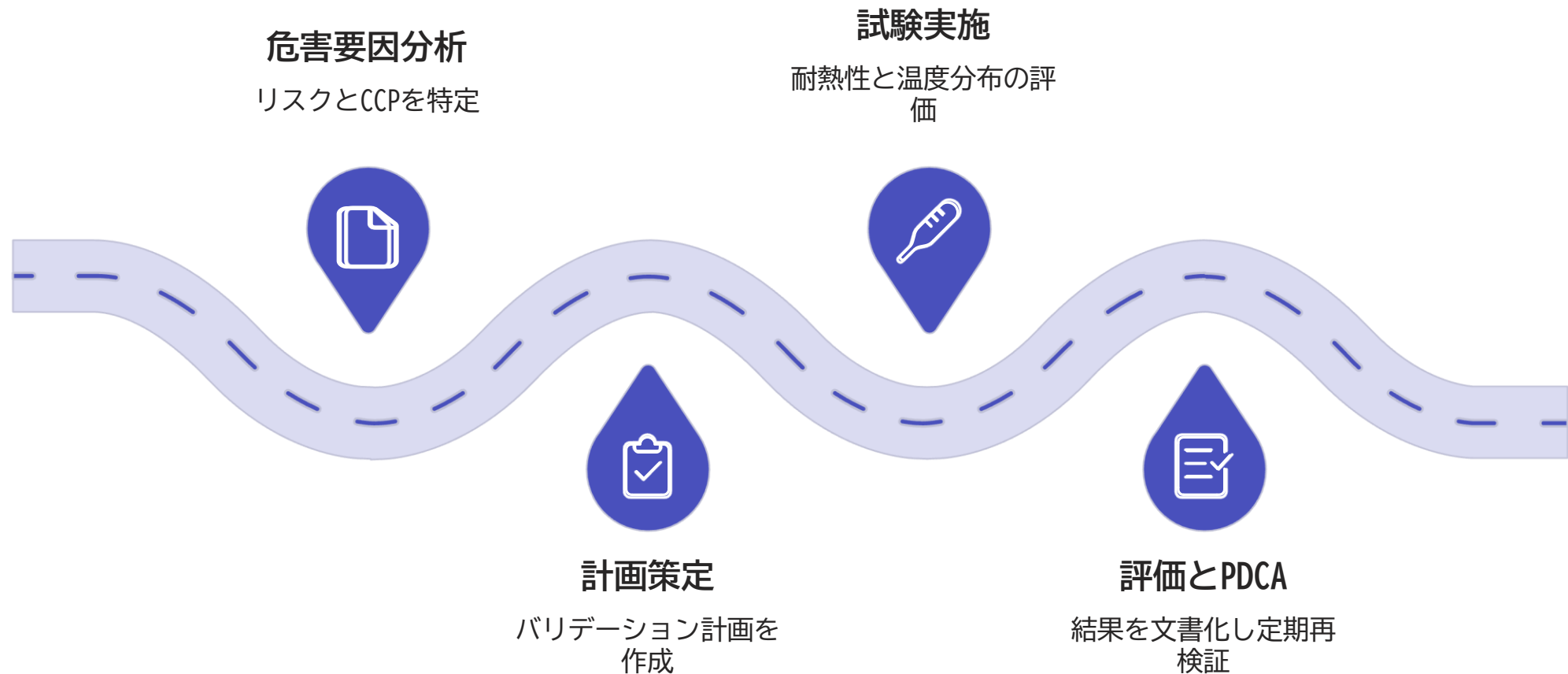
→ 製造設備の改造・更新

充填機・加熱装置・配管の変更は温度分布に影響するため、再バリデーションが必要です。

→ 異常・逸脱の発生

温度逸脱・微生物検査での不適合・クレームの発生は再バリデーションのトリガーとなります。

熱殺菌におけるバリデーション実施の全体像



まとめ：バリデーションで食品安全を確かなものに

基本の徹底

pH・Awに応じた殺菌価の設定と、変敗菌まで含めた危害要因の把握が出発点です。

二領域のバリデーション

菌の耐熱性バリデーションと装置・製品バリデーションを組み合わせ実施します。

継続的な監視

バイオフィルム・装置劣化・ヒューマンエラーを常に意識し、定期的な再バリデーションを実施します。

PDCAで活用

バリデーション結果をPDCAサイクルに乗せ、継続的な品質改善と安全確保を実現します。

TAKE HOME MESSAGE



バリデーションとはなにか

- 熱殺菌単独種目というよりは 「総合種目」
- 製品はどんな菌の生残・増殖を許すのかによって手法が変化
- バイオフィルムの問題まで入れるとバリデーションの期間は
長い

ホットパックのバリデーション

熱殺菌の基本原則

殺菌価の決定要因

対象物のpHと水分活性によって、要求される殺菌価の種類と水準が異なります。製品特性を正確に把握することが出発点です。

食品衛生法の範囲

食品衛生法が要求する殺菌価は食中毒菌（病原性大腸菌など）を対象としています。しかし、それよりもさらに強い耐熱性をもつ変敗菌は対象外であり、別途の対応が必要です。



ホットパック製品のpH特性

ホットパック製品は通常pH4未満であることがほとんどです。この低pH環境では、いわゆる食中毒菌は製品中で増殖できません。この特性がホットパックバリデーションの根幹をなしています。

食品安全危害要因の種類



重篤度による分類

発現しうる危害要因の重篤度に応じて、バリデーションの水準が変わります。



ホットパック特有の危害要因

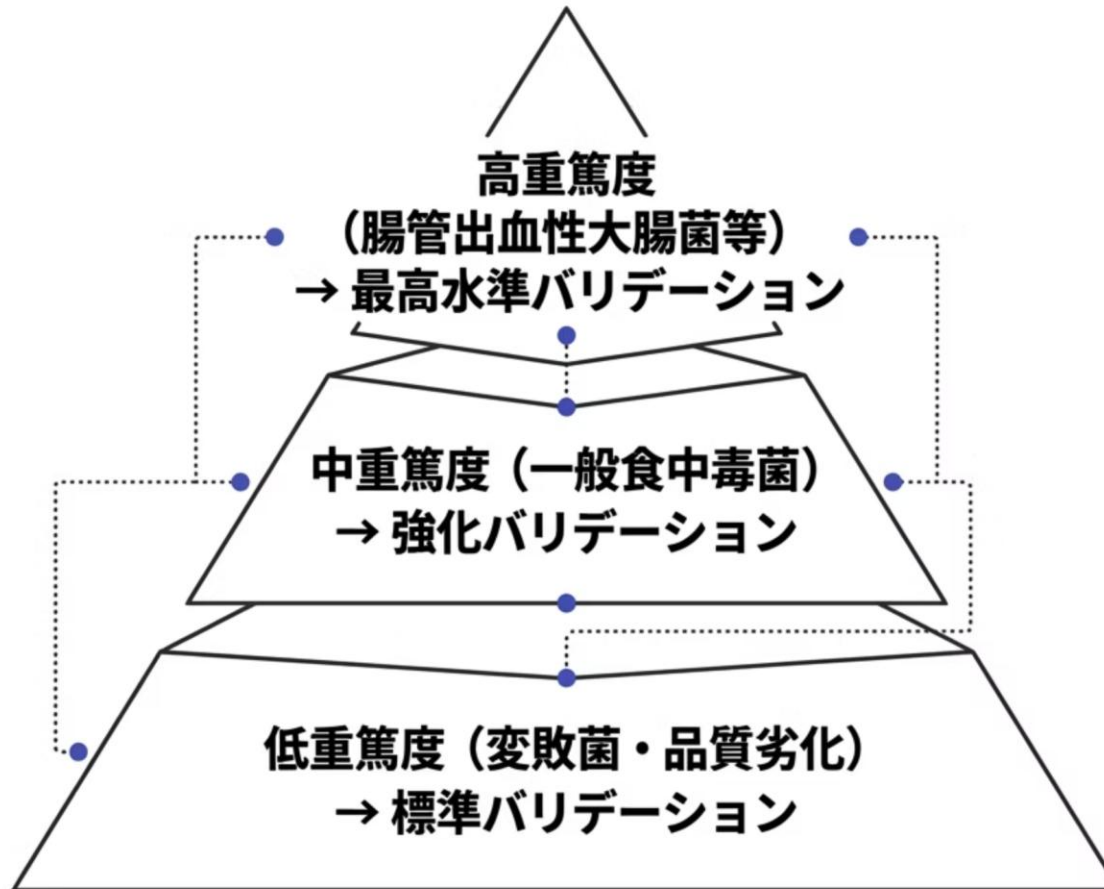
ホットパックで発現しかねない危害要因には固有の特徴があり、個別の評価が必要です。



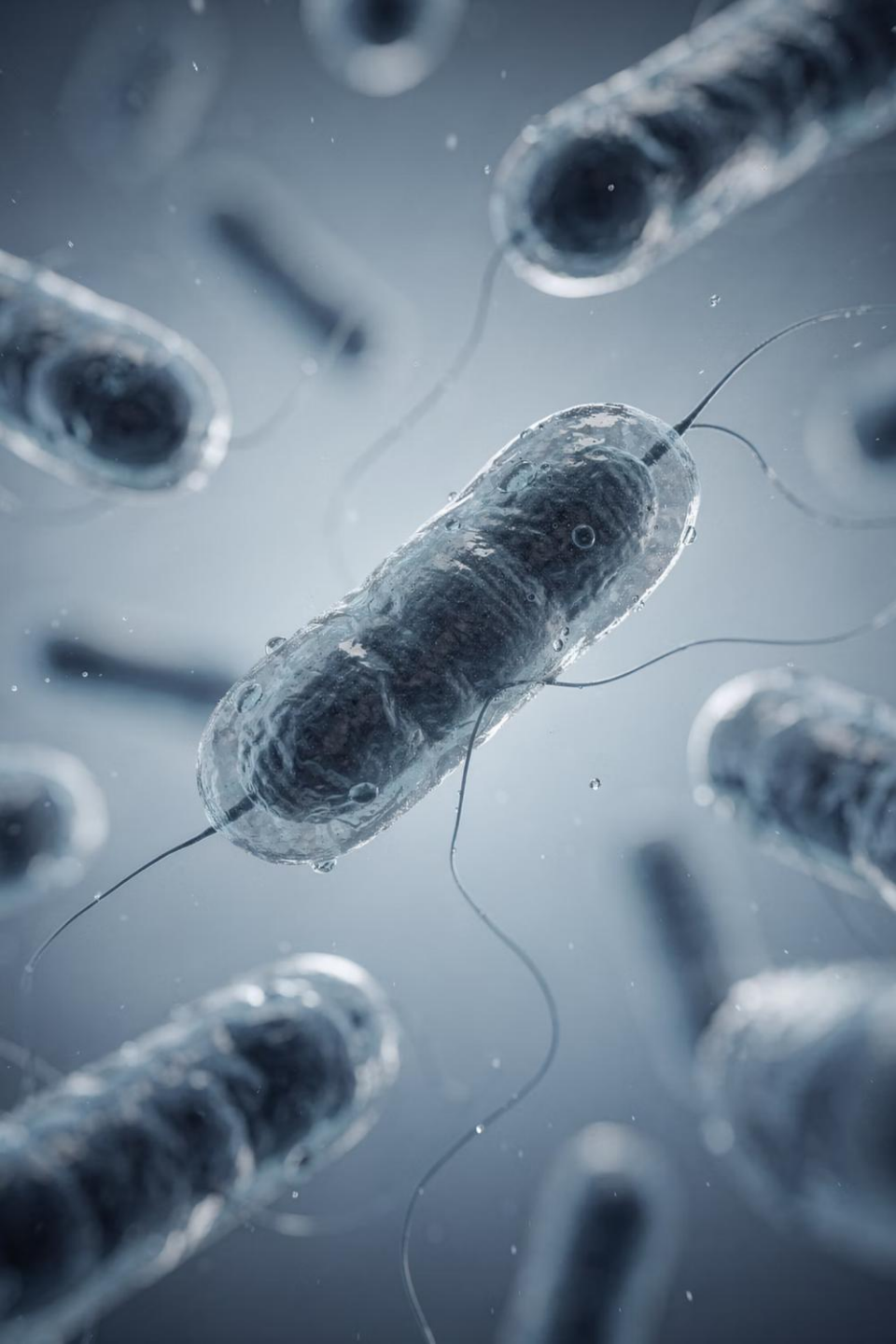
耐熱性のバリデーション

菌自体の耐熱性を科学的に検証するバリデーションが不可欠です。

ホットパックバリデーション水準と危害要因の重篤度



危害要因の重篤度が高いほど、より厳格なバリデーションが求められます。ホットパック製品では低pHにより食中毒菌リスクは低いものの、重篤度に基づく体系的な評価が必要です。



腸管出血性大腸菌のリスク評価

腸管出血性大腸菌のような重篤な食中毒菌がホットパック製品から発見される場合、その原因はほとんどの場合、ホットパック後の容器シール不良による周囲汚染の引き込みと考えられます。製品内での増殖ではなく、二次汚染が主因です。

シール不良と二次汚染のメカニズム



ホットパック充填

容器シール不良

外部からの菌混入

ホットパック後のシール工程は製品安全の最終防衛ラインです。シール不良が発生すると、低pH環境であっても外部からの重篤な菌が製品に混入・生残するリスクが生じます。

ホットパックバリデーションの種類

1

菌の耐熱性バリデーション

対象菌株の熱抵抗性（D値・Z値）を実験的に確認する
または信頼できる資料を得る。

2

製品pH・水分活性の確認

製品特性が殺菌条件の前提を満たしているか検証します。

3

充填・シール工程の検証

容器密封性の確保と二次汚染防止を工程レベルで検証します。

4

保存試験による確認

実際の保存条件下での微生物安定性を実証します。



ホットパックバリデーション結果をオーバーライトしうる要因

微生物の耐熱性の分化

同一菌種でも株によって耐熱性が異なる場合があります、バリデーション結果を無効化しうる重要因子です。

バイオフィルム

特定条件下でのバイオフィルム形成は、通常の殺菌バリデーションの前提を覆す可能性があります。

微生物の耐熱性の分化

分化とは何か

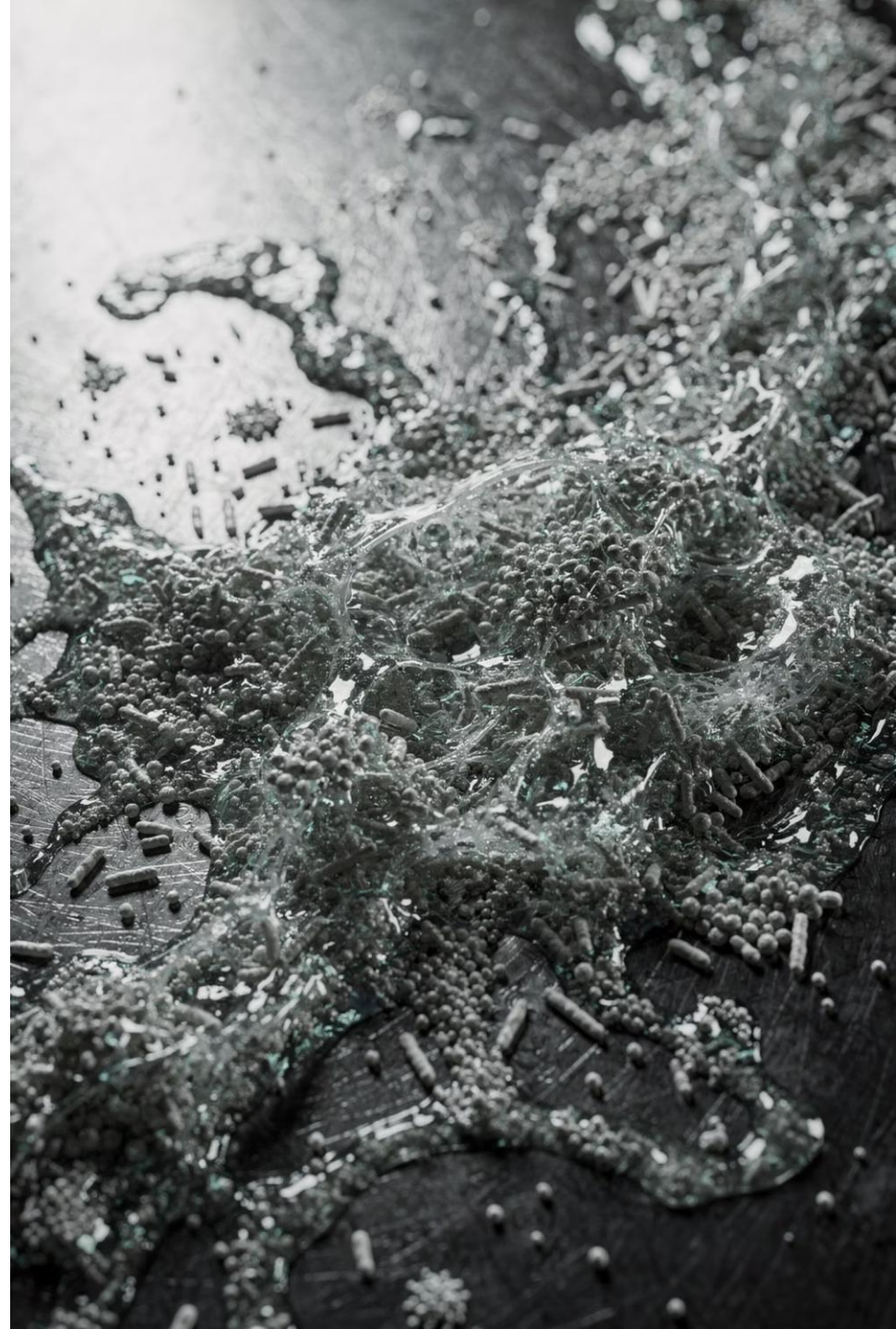
同一菌種・同一株であっても、培養条件や環境ストレスへの適応によって耐熱性が変化することがあります。これをバリデーション時に考慮しないと、実際の殺菌効果が過大評価されるリスクがあります。

バリデーションへの影響

実験室で得られたD値・Z値が、実際の製造環境の菌株に適用できない場合があります。最悪ケースの菌株が存在したとしての推定が重要です。

バイオフィルムとは

バイオフィルムとは、微生物が表面に付着して形成する**保護膜構造**です。通常の殺菌処理に対して高い抵抗性を示し、バリデーション結果を実質的に無効化する可能性があります。製造設備の衛生管理において特に重要な課題です。



ホットパックとバイオフィルムの関係

- ☑ ホットパック製品（pH4未満）では、バイオフィルムの産生はいまのところ報告されていません。低pHがバイオフィルム形成を抑制していると考えられます。

低pHはホットパック製品の大きな安全上の利点です。

ホットパックでバイオフィルムリスクが生じる条件

pH4.6超の製品

pHが4.6を超える製品をホットパックする場合、バイオフィルム形成リスクが理論上発生します。

疑似アセプティックライン

HEPAフィルター等で清浄化した室内でホットパックする「疑似的なアセプティックライン」では、バイオフィルムリスクへの注意が必要です。

過去の事例

ブラックコーヒー・緑茶・紅茶等でこの手法が試みられた時期がありましたが、現在はアセプティック充填に置き換えられています。

つまり疑似アセプティック（簡易無菌充填）で 中性域の製品を扱い始めたとき

飲料製品における歴史的変遷

ブラックコーヒー・緑茶・紅茶等のpH4.6超飲料では、過去にHEPAフィルター清浄室でのホットパックが試みられました。しかし現在ではアセプティック充填に置き換えられ、疑似アセプティックラインはほとんど姿を消しています。技術の進歩が安全性を向上させた好例です。

ホットパックバリデーションの特殊性：全体像



低pH環境

pH4未満が食中毒菌増殖を抑制する根本的な安全因子



シール管理

二次汚染防止のための容器密封性確保が最重要工程



耐熱性分化

最悪ケース菌株によるバリデーションで信頼性を確保



バイオフィルム

低pHでリスク低、pH4.6超では別途評価が必要

pH別リスクマトリクス

| pH区分 | 食中毒菌増殖 | バイオフィルム | 主な対応 |
|--------------------|--------|---------|-------------|
| pH4.0未満（典型的ホットパック） | 増殖不可 | 報告なし | シール管理・変敗菌対策 |
| pH4.0～4.6 | 増殖困難 | リスク低 | 強化バリデーション |
| pH4.6超 | 増殖可能 | リスクあり | アセプティック充填推奨 |

製品のpHはバリデーション戦略全体を規定する最重要パラメータです。pH4.6を境界として要求水準が大きく変わります。

変敗菌への対応：見落とされがちなりリスク

食品衛生法が要求する殺菌価は食中毒菌を対象としており、より強い耐熱性をもつ変敗菌は対象外です。ホットパック製品では食中毒リスクが低い一方、変敗菌による品質劣化リスクは別途評価が必要です。法令遵守だけでは不十分な場合があります。

⚠ 変敗菌は食中毒を引き起こさないものの、製品品質を著しく損ないクレーム・回収につながる可能性があります。
バリデーションの範囲を変敗菌まで拡張することが推奨されます。

◆ AI による概要

清涼飲料水や果汁加工品の製造において、通常の加熱殺菌（65～85℃）を生き抜く「耐熱性好酸性菌（*Alicyclobacillus*属など）」や「耐熱性カビ」の混入・増殖が大きな品質問題となっています。これらは健康被害を起こしませんが、異臭・変敗の原因となります。
www.microbio.co.jp +3

⚠ 問題の核心

1. 生存条件：

- 食品衛生法で定められた酸性飲料の殺菌条件（例：pH4.0未満で65℃・10分、またはpH4.0～4.6で85℃・30分）に耐え得る芽胞を形成します。
- 酸性の環境（pH 2.0～5.0）を好み、製品の賞味期限内に増殖してしまいます。
[Google Patents](#) +3

2. 異臭の発生：

- 代表的な菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*）は、成分を分解して「グアイアコール」などの不快臭（薬品臭やスモーキー臭）を産生し、製品の商品価値を完全に失わせます。
www.microbio.co.jp +2

✳ 対策と予防アプローチ

品質を維持するためには、以下の対応が効果的です。

- **原料管理・検査の徹底：**
原料（果汁濃縮液など）の段階で、耐熱性好酸性菌（TAB）の検査を実施し、汚染された原料を排除します。また、定期的な製造環境のモニタリングが不可欠です。
[🇯🇵 日本食品分析センター](#)
- **非加熱殺菌技術の導入：**
熱に頼らない殺菌方法（紫外線殺菌、膜ろ過（メンブランフィルター）、高圧処理、パルス電界処理など）を併用することで、風味を損なわずに芽胞を不活化させます。
[🇯🇵 農林水産省 +1](#)
- **芽胞の増殖抑制：**
ボトリング後の冷却を迅速に行うことや、冷蔵流通（コールドチェーン）の適用により、万一菌が生存していても発芽・増殖しにくい環境を保ちます。

ホットパックバリデーションの実例

バリデーションというよりは事件簿

初心者による熱浸透検証の不足・不在

pHによってF値の計算式・目標値を変えないといけないという理解の不足・不在、ヘッドスペースは乾熱とながちな理解の不足、蓋材は汚染を蓄積しがちという理解の不足

初心者、中級者、上級者を問わず 想定されていない菌による汚染、包材の密封性不良

食品安全は絡んでいない

容器内側の「隅っこ」が殺菌しにくい

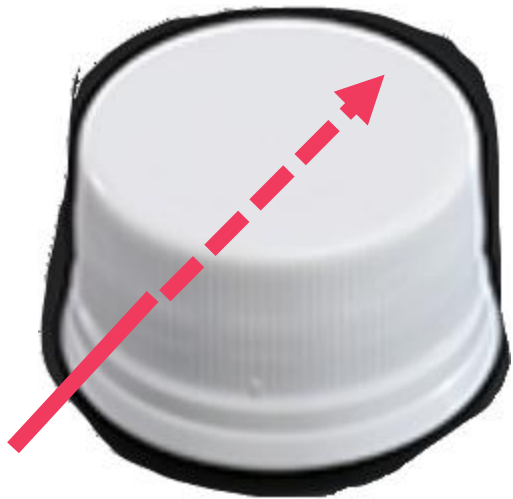


容器内側の「隅っこ」が殺菌しにくい

➤ 転がす・ゆするなどの動作で

境膜破壊、対流支援

➤ たまには 外からの加熱も組み合わせる



内部よりの熱では十分な殺菌が出来ないとき

- 外からも熱を加えてやる
- (キャップの薬剤殺菌・化学殺菌)





<https://www.youtube.com/watch?v=3MVsLJy3J6M&t=326s>

ホットパックでのバリデーション

- 一番熱の到達しにくい包材内面の隅っこへの
熱量 つまり 殺菌価を測定する方法がない
- 通常 製品の方の殺菌価だけ追及されている
- 包材はどんどんきれいになってきているので
実は殺菌しなくてもいいことも多い
- 食品安全事件は起きづらいので企業努力に任されている

あくまで冗談だが実際に経験した事件はこれくらい

唯一の例外: 酵母の発生するガスによる 瓶の破裂



TAKE HOME MESSAGE



ホットパックのバリデーション

- 通常pHが低く食中毒菌の懸念はない
- 低pHのためバイオフィルムの生成も考えにくい
- 包材内面の殺菌は 汚染度と菌種による。黄金律はない

レトルトのバリデーション

レトルト食品の基本分類

レトルト食品はpHによって大きく2種類に分類され、その性格は大きく異なります。

高酸性食品 (pH < 4.6)

酸性環境により病原菌の増殖が抑制されるため、殺菌要件は比較的緩やかです。

低酸性食品 (pH > 4.6)

ボツリヌス菌の増殖・毒素産生リスクがあるため、厳格な殺菌と容器密封性の維持が不可欠です。



低酸性食品とボツリヌス菌リスク

低酸性レトルト食品では、ボツリヌス菌の増殖とその毒素産生が最大の危害要因です。製品の殺菌に対して厳しい基準が求められるばかりか、容器の密封性維持にも多大の関心を払わなければなりません。

- ⊗ 容器の密封性が壊れて外から空気や水が侵入した場合、折角レトルト殺菌した製品も再度危険な菌に汚染されます。低酸性食品は栄養分に富んでいることが多く、侵入した菌の増殖を支援するため非常に危険です。

熱殺菌の基本原則

殺菌価の決定要因

対象物のpHと水分活性によって、殺菌価の種類と要求水準が異なります。

食品衛生法の要求水準

食品衛生法が要求する殺菌価は食中毒菌に対するものです。さらに強い耐熱性をもつ変敗菌はその対象に含まれていない点に注意が必要です。

食品安全危害要因の概要

レトルト食品のバリデーションでは、発現しうる危害要因の重篤度に応じてバリデーションの水準が変わってきます。



危害要因の重篤度

発現しうる危害の深刻さに応じて、求められるバリデーションの水準が決定されます。



菌の耐熱性評価

対象菌自体の耐熱性をバリデーションすることまたは信頼できるデータを取り寄せることが、熱殺菌設計の基礎となります。



バリデーションの種類

レトルト食品の熱殺菌バリデーションには複数の手法があり、食品の特性に応じて選択されます。

高酸性食品の危害要因

高酸性食品（pH < 4.6）では、酸性環境が多く、病原菌の増殖を抑制するため、低酸性食品ほどの厳密さは求められません。発現しうる危害要因の種類と重篤度は限定的であり、バリデーションの要求水準も相対的に低く設定されます。

- ① 高酸性環境ではボツリヌス菌は増殖できないため、低酸性食品で必須となる厳格な芽胞菌対策は不要です。ただし、酸性に強いカビや酵母による変敗リスクには引き続き注意が必要です。

低酸性食品の危害要因

低酸性レトルト食品では、発現しうる危害要因が多岐にわたり、バリデーションの水準も最も厳格です。

ボツリヌス菌（芽胞形成）

嫌気性環境で増殖し、致死性の高い毒素を産生します。最も重篤な危害要因です。

その他の病原性芽胞菌

ウェルシュ菌など、芽胞を形成する病原菌も低酸性環境で増殖リスクがあります。通常ボツリヌスより高い耐熱性を持ちます

耐熱性変敗菌

食中毒は引き起こさないものの、製品品質を損なう耐熱性の高い変敗菌も危害要因となります。

菌の耐熱性バリデーション

D値 (decimal reduction time)

一定温度において菌数を90%減少させるのに要する時間。菌種・温度ごとに異なります。

Z値・F値による評価

Z値はD値が10倍変化するのに必要な温度差、F値は基準温度における等価殺菌時間を示します。これらを組み合わせて殺菌工程の妥当性を評価します。

菌自体の耐熱性データを正確に把握することが、熱殺菌バリデーション設計の根幹をなします。対象菌の耐熱性パラメータを実験的に取得し、または信頼できるデータを取り寄せ 設計した殺菌工程が十分な殺菌価を達成できるかを検証します。

熱殺菌バリデーシヨンの種類

レトルト食品の熱殺菌バリデーシヨンには、目的や段階に応じた複数の手法があります。

01

熱分布・熱浸透試験

装置内部および製品の最冷点（cold point）を特定し、そこでの温度履歴を測定します。

02

殺菌価（F値）計算

測定した温度履歴から積算殺菌価を算出し、目標F値を達成しているか確認します。

03

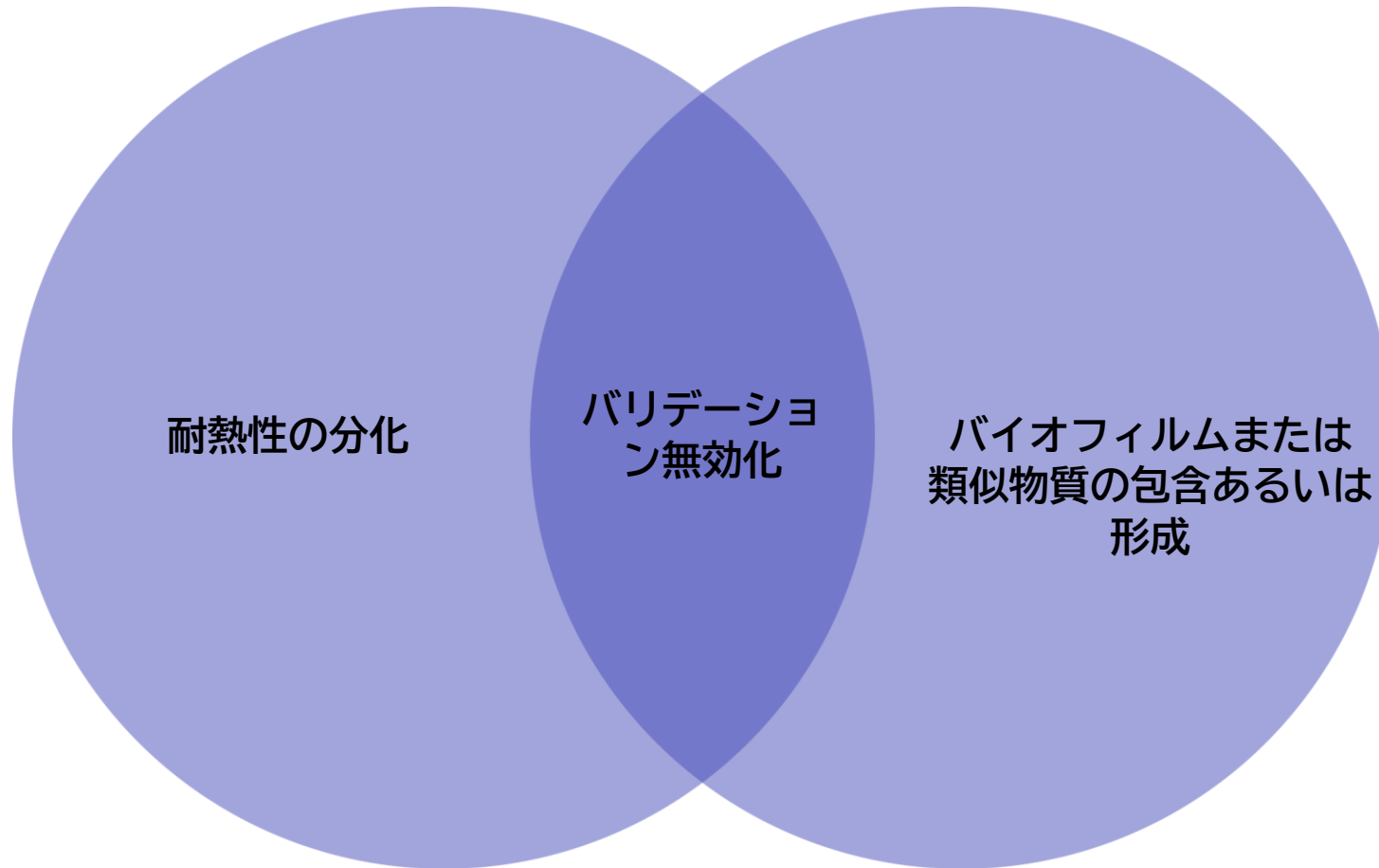
時に接種試験（inoculated pack study）

実際に菌を接種した製品を用いて、設定した殺菌工程の有効性を生物学的に確認することもあります



バリデーション結果をオーバーライトしうる要因


適切に設計・実施された熱殺菌バリデーションであっても、その結果を無効化しうる要因が存在します。主に**微生物の耐熱性の分化**と**バイオフィルム**の2つが重要な課題です。



これらの要因は、バリデーション時には想定されていなかった条件を現場にもたらし、設計した殺菌工程の有効性を損なう可能性があります。

微生物の耐熱性の分化

微生物は環境への適応により、耐熱性が分化（変化）することがあります。バリデーション時に使用した菌株の耐熱性データが、実際の製造環境に存在する菌株には当てはまらない場合があります。

 バリデーションに用いた菌株よりも高い耐熱性をもつ変異株や適応株が現場に存在する場合、設計した殺菌工程では十分な殺菌価が達成できない恐れがあります。定期的な（予想される）耐熱性の見直しと再評価が重要です。

バイオフィルムとは

バイオフィルムの形成

菌が表面に付着し、多糖類などの保護マトリクスを形成した集合体です。通常の洗浄・殺菌では除去が困難です。

製造ラインへの影響

低酸性レトルト食品の製造工程では、芽胞菌によるバイオフィルムが生じやすく、ラインの殺菌を著しく困難にします。芽胞菌が製品に混入した場合、熱殺菌は非常に困難になります。

バイオフィルムが殺菌に与える影響

バイオフィルム内の芽胞菌は、保護マトリクスに守られることで通常よりも高い耐熱性を示します。これにより、バリデーション時に設定した殺菌条件では不十分となる場合があります。

芽胞菌の混入リスク

バイオフィルム由来の芽胞菌が製品に混入すると、レトルト工程での熱殺菌が非常に困難になります。

ライン殺菌の困難化

バイオフィルムは通常の洗浄・殺菌剤に対して高い抵抗性を示し、製造ラインの衛生管理を複雑にします。



黒漆塗純革札歯孕奇威胴丸具足

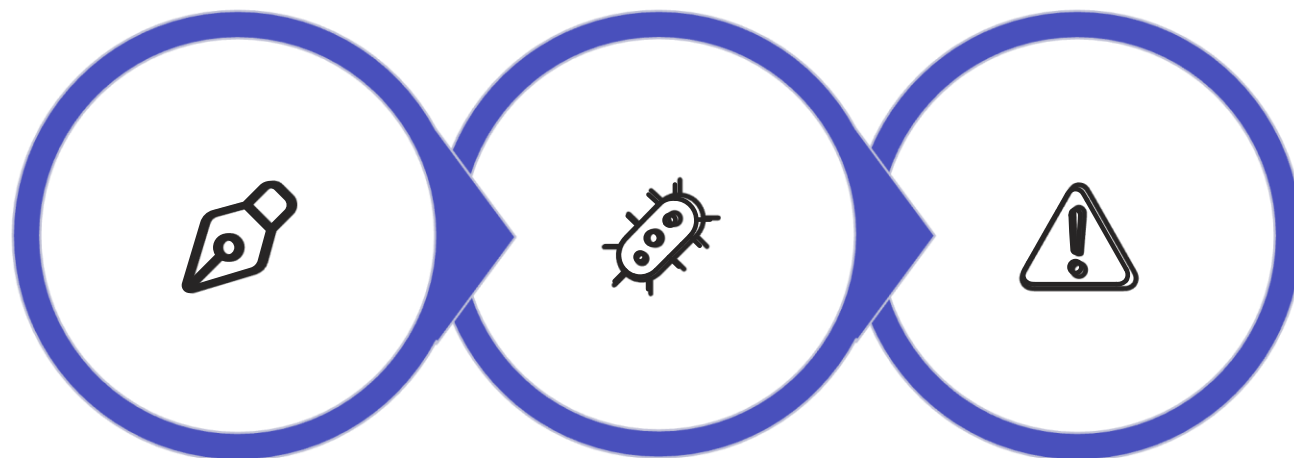
耐熱性毒素を産生する生物の特別なリスク

バイオフィルムに関連する危害要因の中でも、特に注意が必要なのが毒素産生型の生物です。

- ⊗ 途中の製造ラインで耐熱性毒素を産生した場合、その毒素はレトルト工程では必ずしも完全に分解されません。その結果、最終製品が毒素に汚染されるという深刻なリスクが生じます（ヒスタミン、セレウリド、黄色ブドウ球菌産生のエンテロトキシン）

生物そのものは熱で死滅させても、すでに産生された毒素が製品中に残存する可能性があるため、レトルト以前の工程の衛生管理が極めて重要です。

毒素残存リスクのメカニズム



必ずではないが頻
繁にバイオフィル
ム形成

増殖と毒素産生

生物は死滅 しかし
毒素は残存

このメカニズムは、レトルト工程後の製品安全性だけでなく、製造ライン全体の衛生管理の重要性を示しています。バリデーシヨンの視点を最終工程だけでなく、製造プロセス全体に広げる必要があります。

製造ライン衛生管理の重要性

バイオフィルムと毒素産生リスクを踏まえると、製造ラインの衛生管理はレトルト殺菌バリデーションと同等に重要な管理点です。

定期的なライン洗浄

バイオフィルム形成を防ぐため、適切な洗浄・殺菌プログラムの実施と検証が必要です。

環境モニタリング

製造環境中の芽胞菌汚染状況を定期的にモニタリングし、早期に異常を検知します。

原材料管理

芽胞菌汚染リスクの高い原材料を特定し、受入れ段階から管理することが重要です。

包材密封性とバリデーション

密封性維持の重要性

低酸性食品では、容器の密封性が壊れると外部から空気・水・菌が侵入し、レトルト殺菌済み製品が再汚染されます。

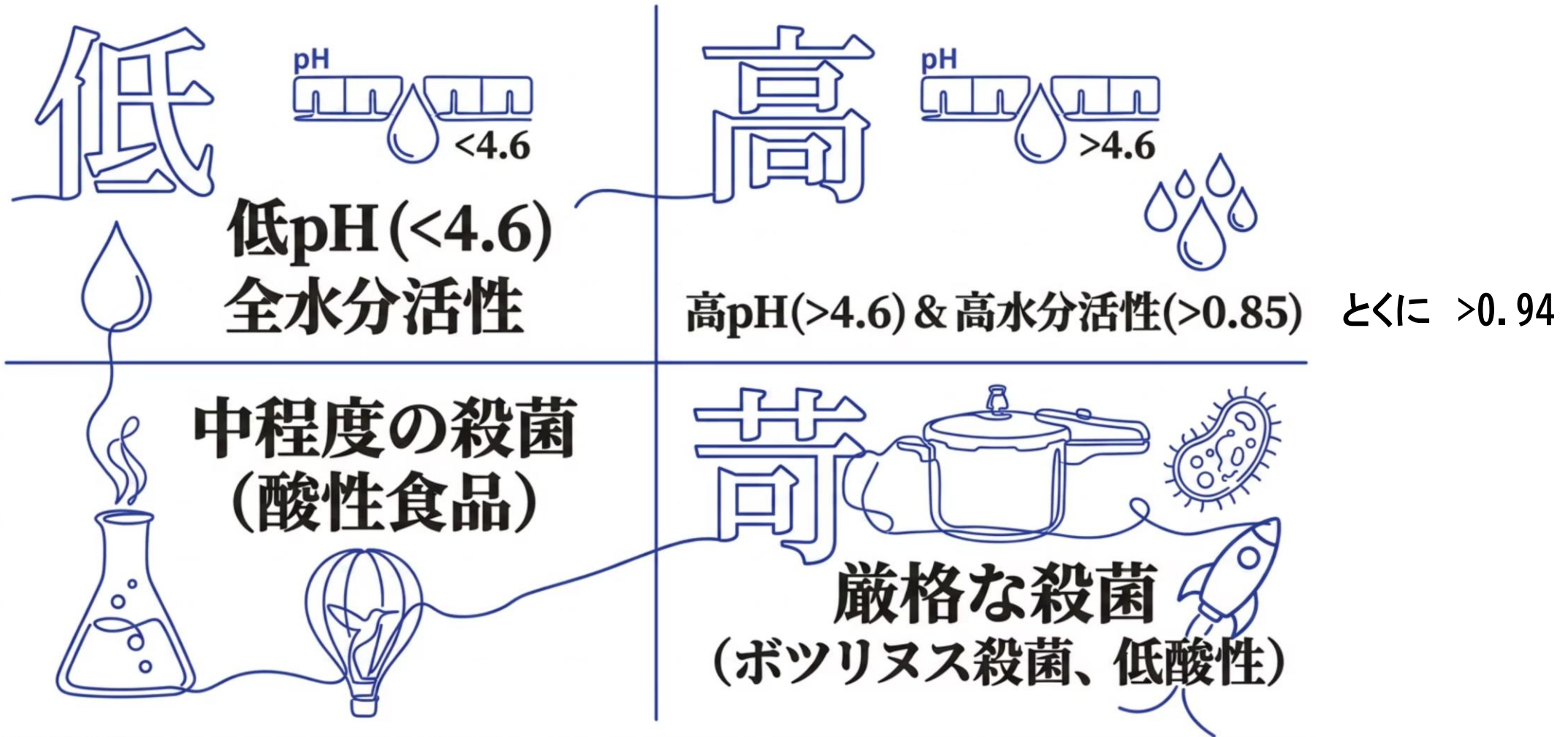
密封性バリデーション

容器の密封性は熱殺菌バリデーションと並行して検証されなければなりません。シール強度試験、リーク試験などにより、流通・保管中を通じた密封性の維持を確認します。

- ① 高酸性食品の場合、仮に密封性が損なわれても低酸性食品ほどの深刻なリスクは生じませんが、品質劣化や変敗のリスクは依然として存在します。

pH・水分活性と殺菌価の関係

熱殺菌バリデーションの設計において、製品のpHと水分活性（Aw）は殺菌価の種類と要求水準を決定する根本的なパラメータです。



レトルトバリデーションの全体像

1 危害要因分析

pH・Awに基づき、発現しうる危害要因と重篤度を特定します。

1

2

2 耐熱性データ取得

対象菌のD値・Z値を実験的に取得し、殺菌工程を設計します。

3

3 熱分布・熱浸透試験・F値計算

最冷点の温度履歴を測定し、目標殺菌価の達成を確認します。

4

4 オーバーライト要因の評価

機器の劣化、耐熱性の分化・バイオフィルム・毒素残存リスクを評価・管理します。

5

5 継続的モニタリング

製造ライン衛生・容器密封性・菌株耐熱性を定期的に再評価します。

レトルトバリデーシヨンの要点

pH分類が基本

高酸性・低酸性の区別がバリデーシヨン水準を決定する出発点です。

低酸性食品は最厳格

ボツリヌス菌リスクへの対応と容器密封性維持が不可欠です。

オーバーライト要因に注意

耐熱性の分化とバイオフィルム・毒素産生が設計を無効化する最重要リスクです。

工程全体で管理

最終殺菌工程だけでなく、製造ライン全体の衛生管理がバリデーシヨンの一部です。

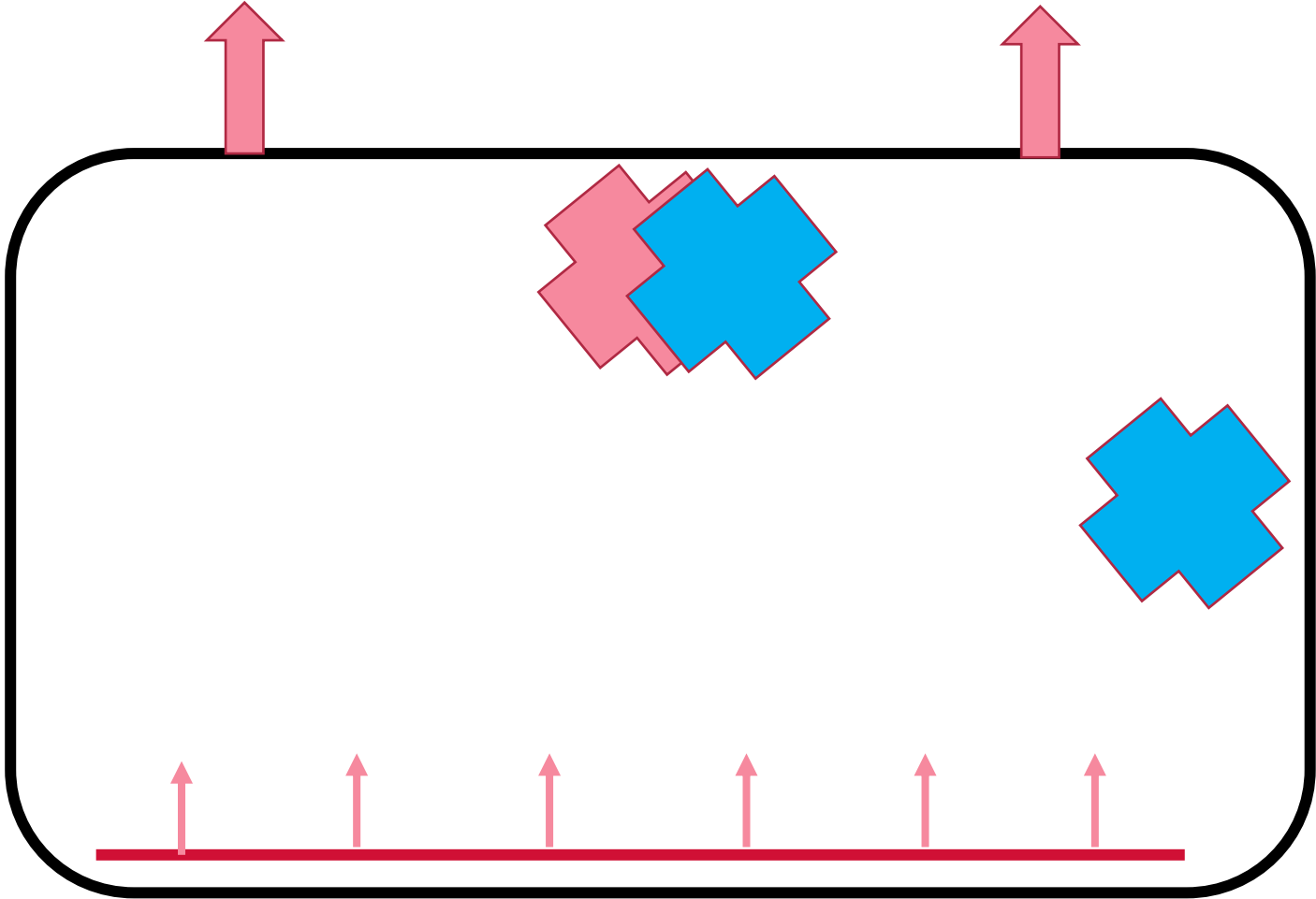
レトルトバリテーションの実務

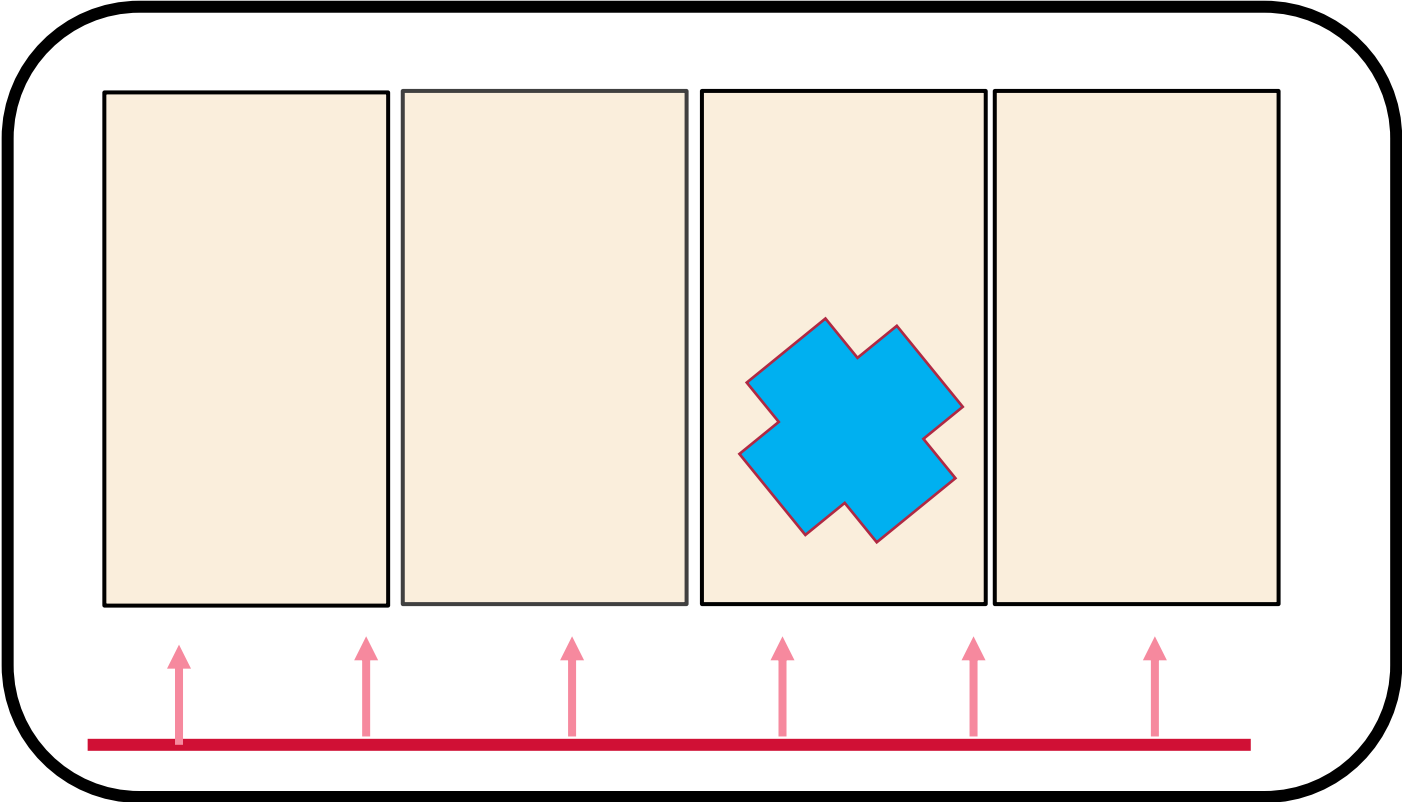
レトルトバリデーションの実務

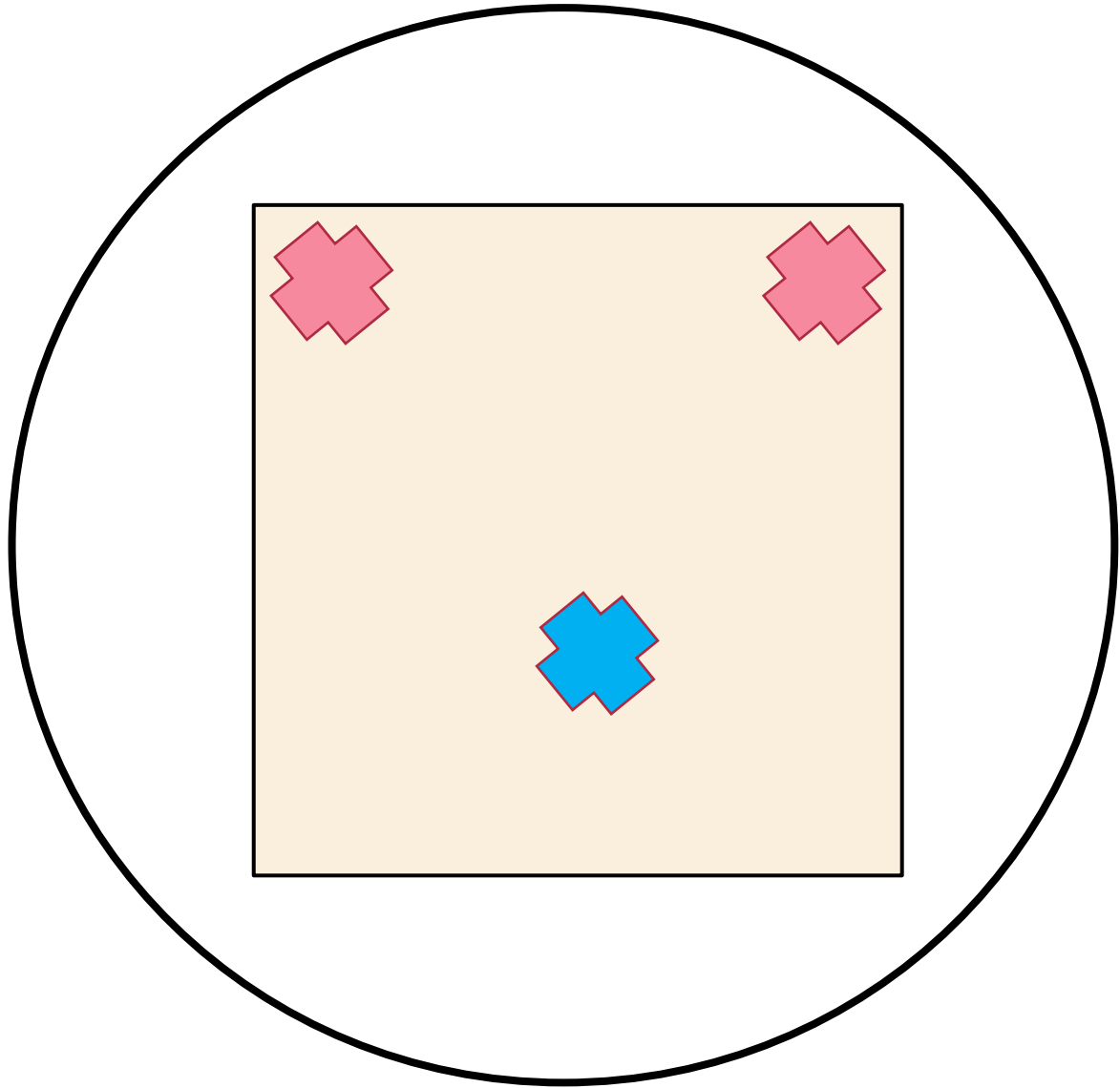
1. 熱分布試験
2. 熱浸透試験
3. 最終製品の商業的無菌性確認

レトルト装置内部の熱分布

- コールドスポットは 多様な形態で現れる・
移動する
- 蒸気式のレトルトで(空運転の場合とくに)
レトルト内 上部、または 前後のドアの内側
- 実運転では 真ん中の台車の下から1/3 ~1/5の
位置であることが多い
- 台車が 全部満車の場合と 一部空車の場合でも
移動する







IFTPS方式



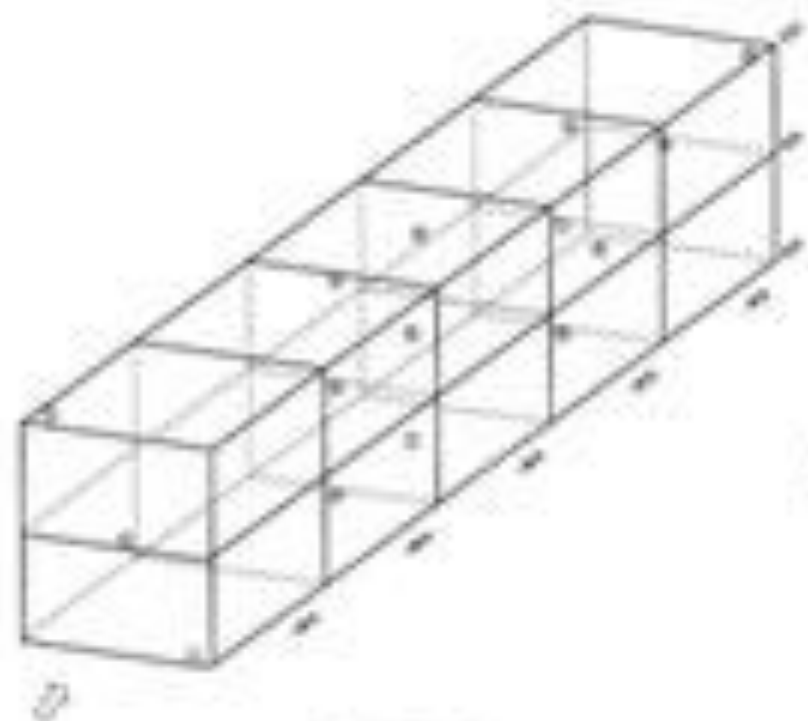


Figure 12

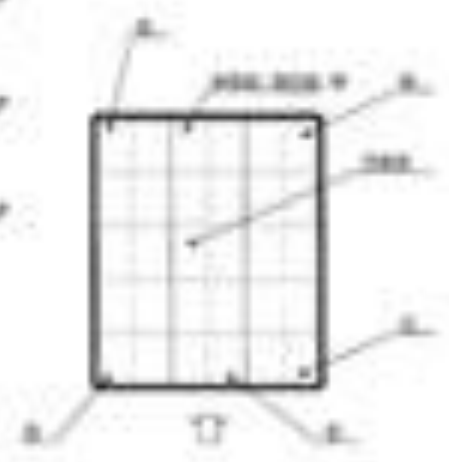


Figure 13





Connecting People, Science and Regulation ©

Steam Sterilization and the 2007 Revision of PDA Technical Report 1

14 November 2007

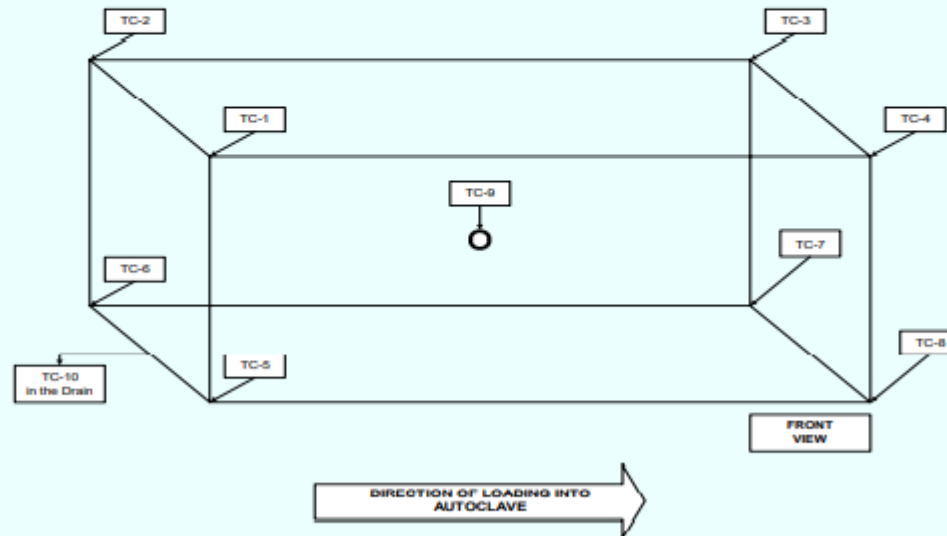
Presented By:

Mike Finger (Tunnell Consulting)

Don Drew (Abbott Bioresearch Center)

Empty Chamber Temperature Distribution Test: (continued)

Empty Chamber Temperature Distribution Thermocouple Placement Diagram

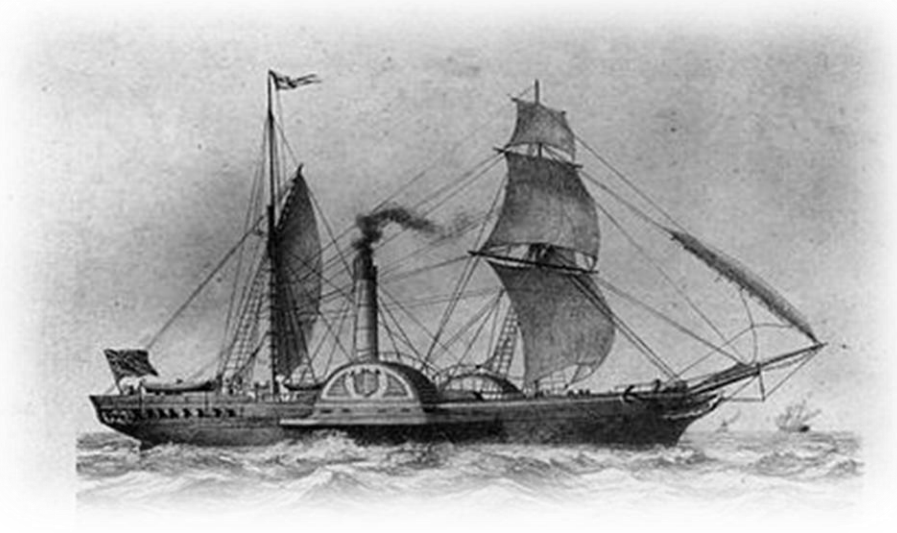


熱分布検証

- レトルト分野で 検証という概念が もっとも発展しているが それでもユニバーサル手法が確立されているわけではない
- 先進国の中では 特に日本が無法地帯
- 相変わらず 「蓋閉めてスイッチ入れて あとは製品が出てくるまで コーヒーでも飲んで待ってましょ」感覚で製造している

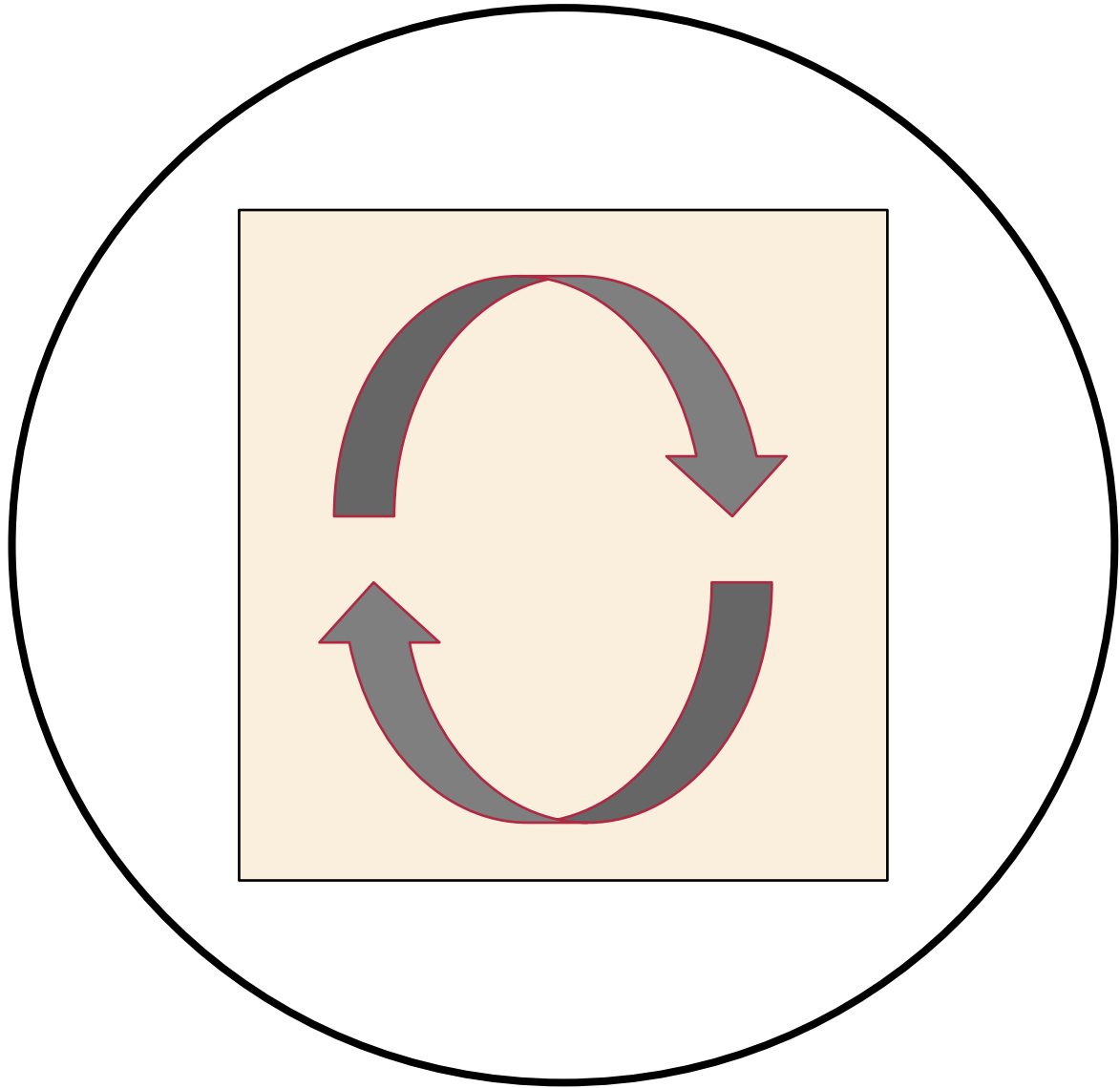
熱分布の改善のために・・・

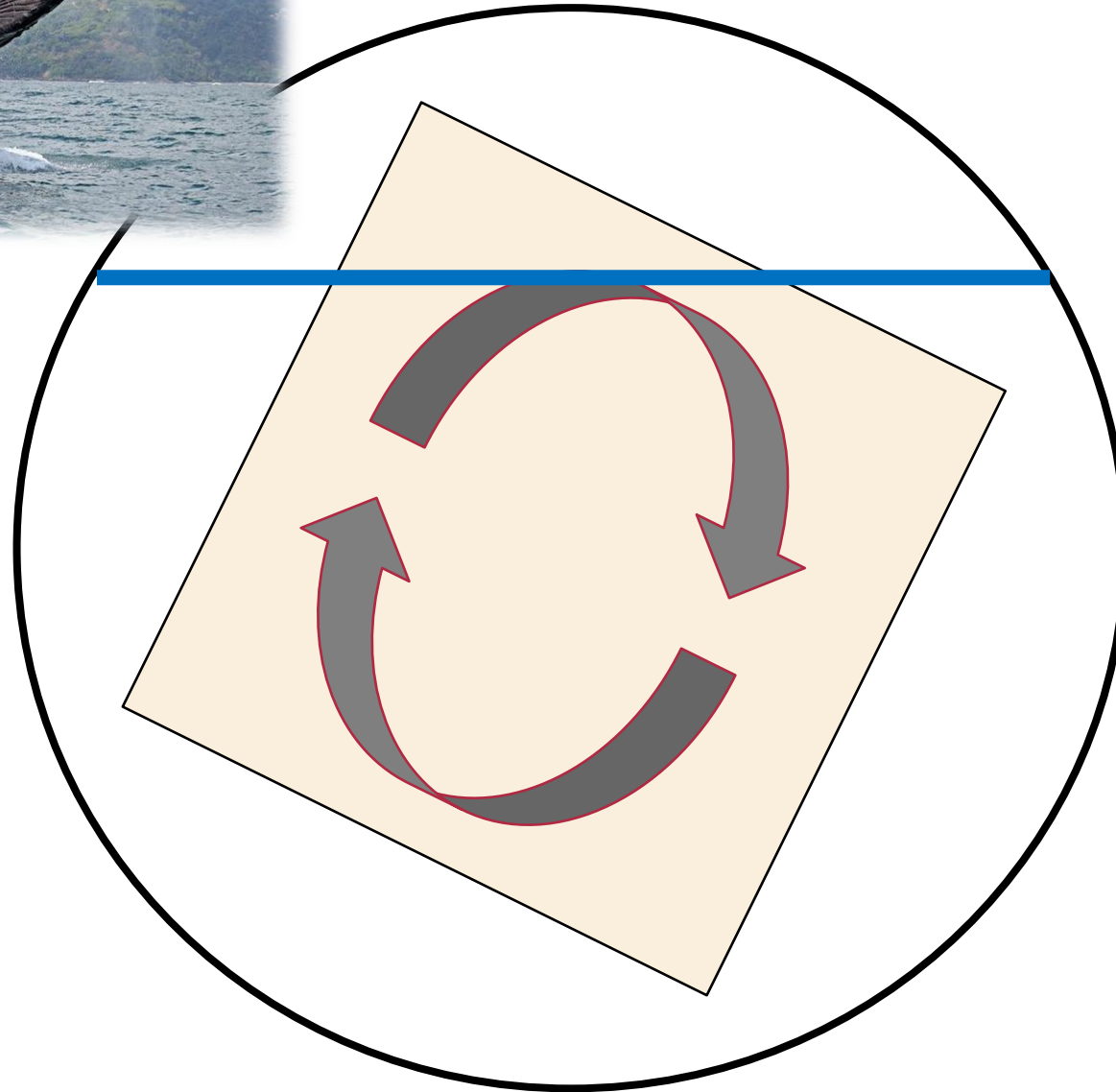
- 熱媒体を動かす(台車中心部へ熱を浸透させる＋製品表面での掻きとり効果を上げる)
- 製品も熱媒体も動かす(パドリング効果・水切り効果で台車中心部へ熱を浸透させる＋製品表面での掻きとり効果)
- 通常はやらないが 製品充填温度を上げることも・・・ある・・・
充填機の耐熱性菌汚染

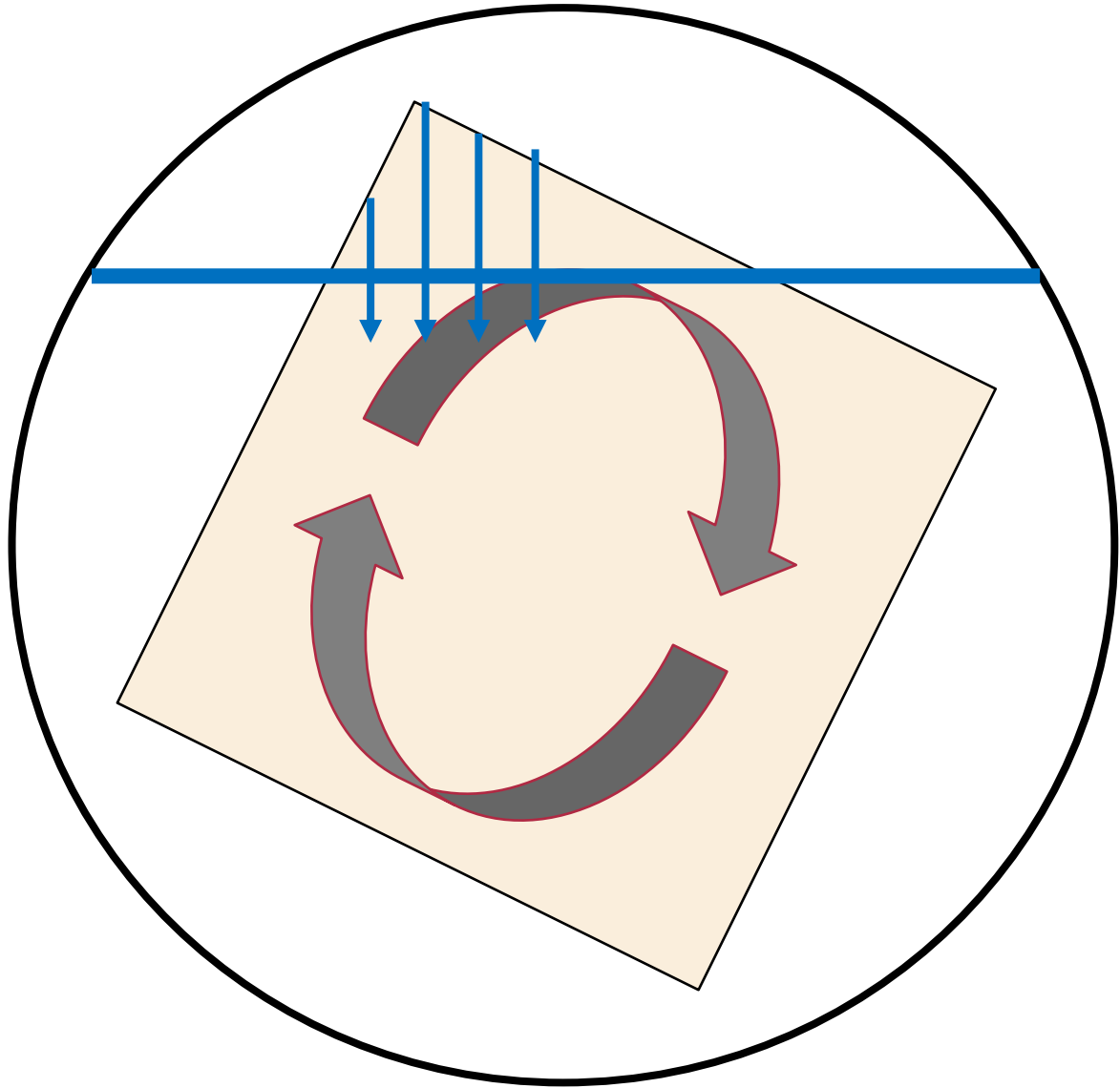


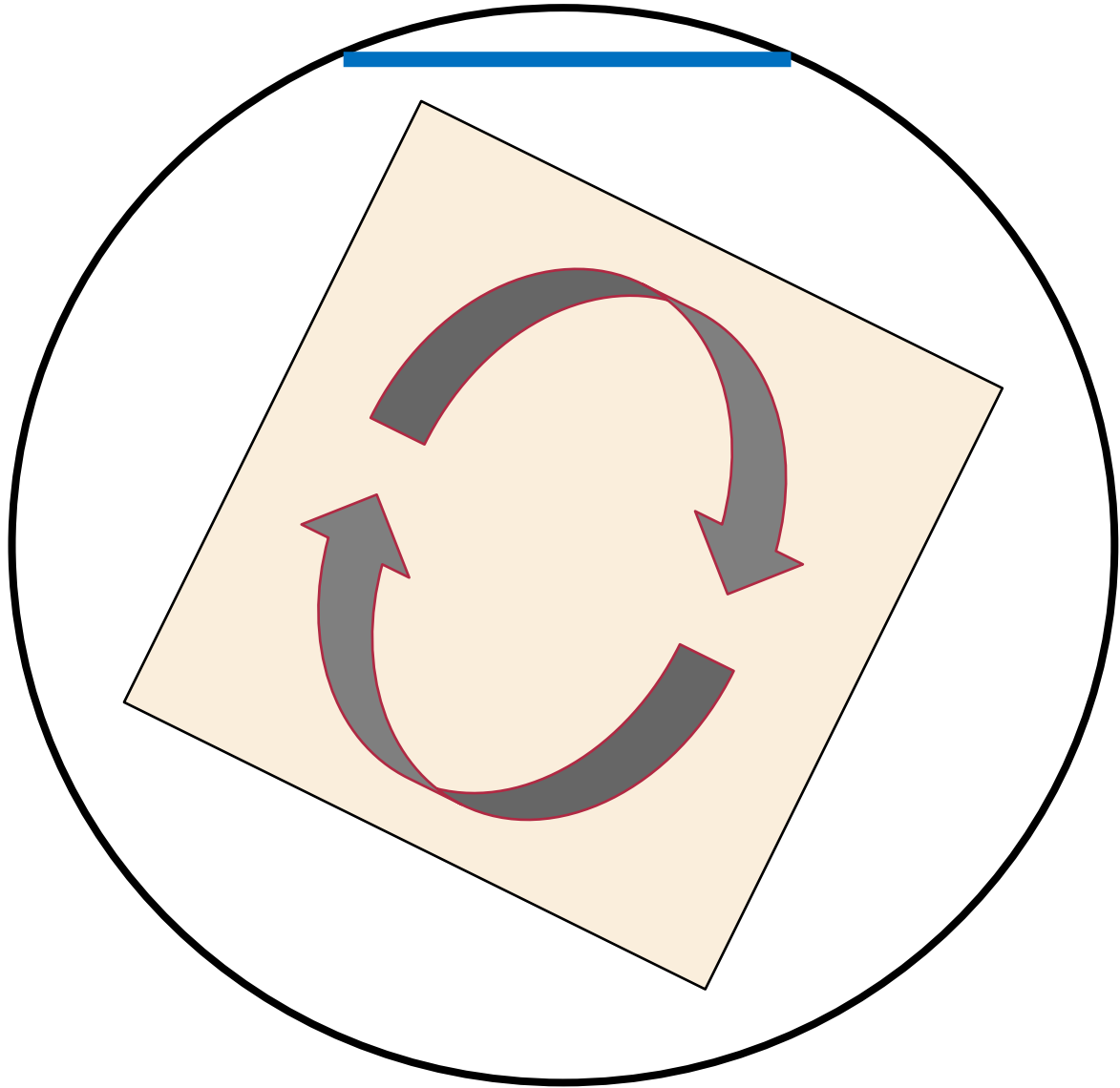


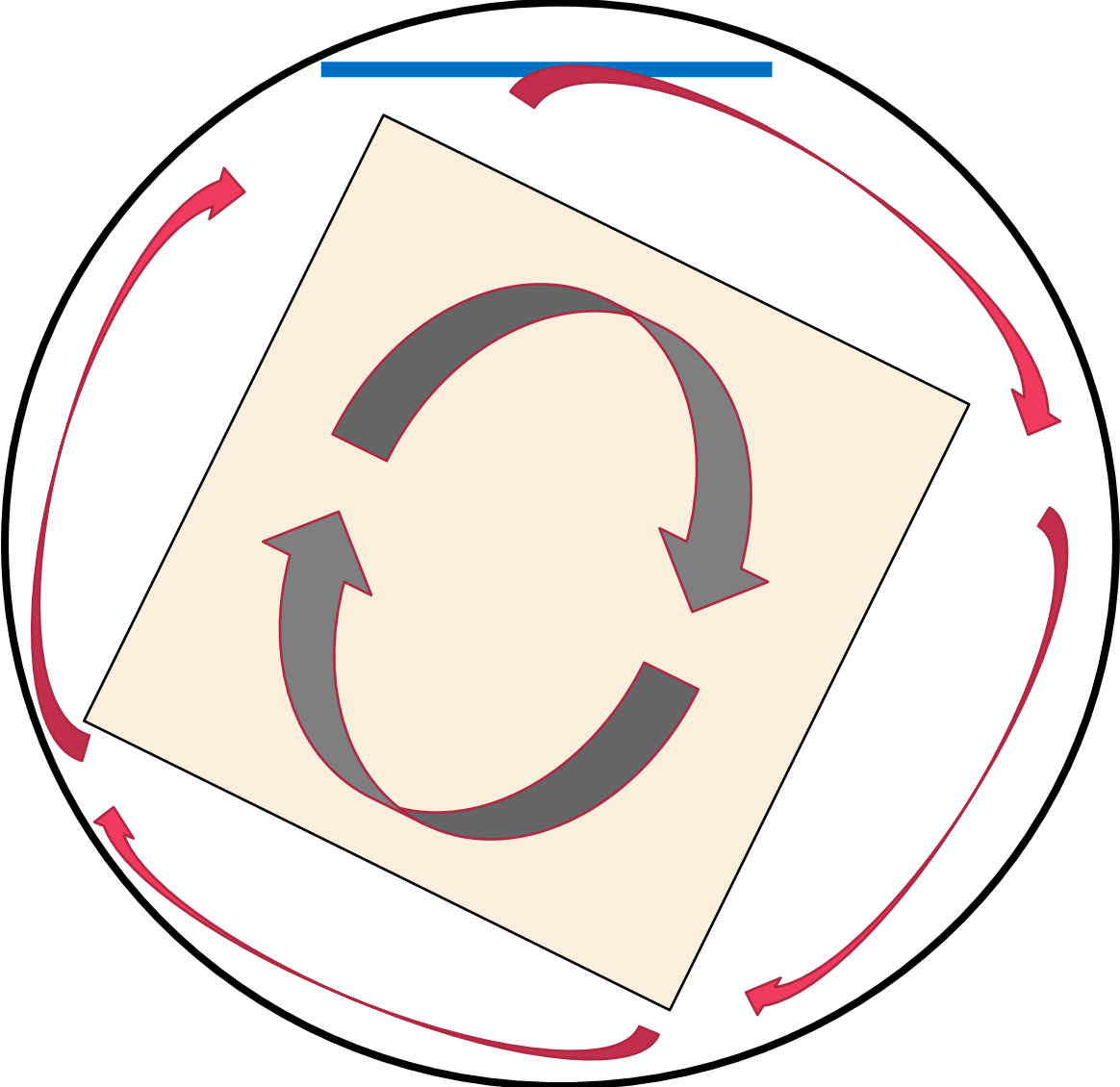
貯湯回転式

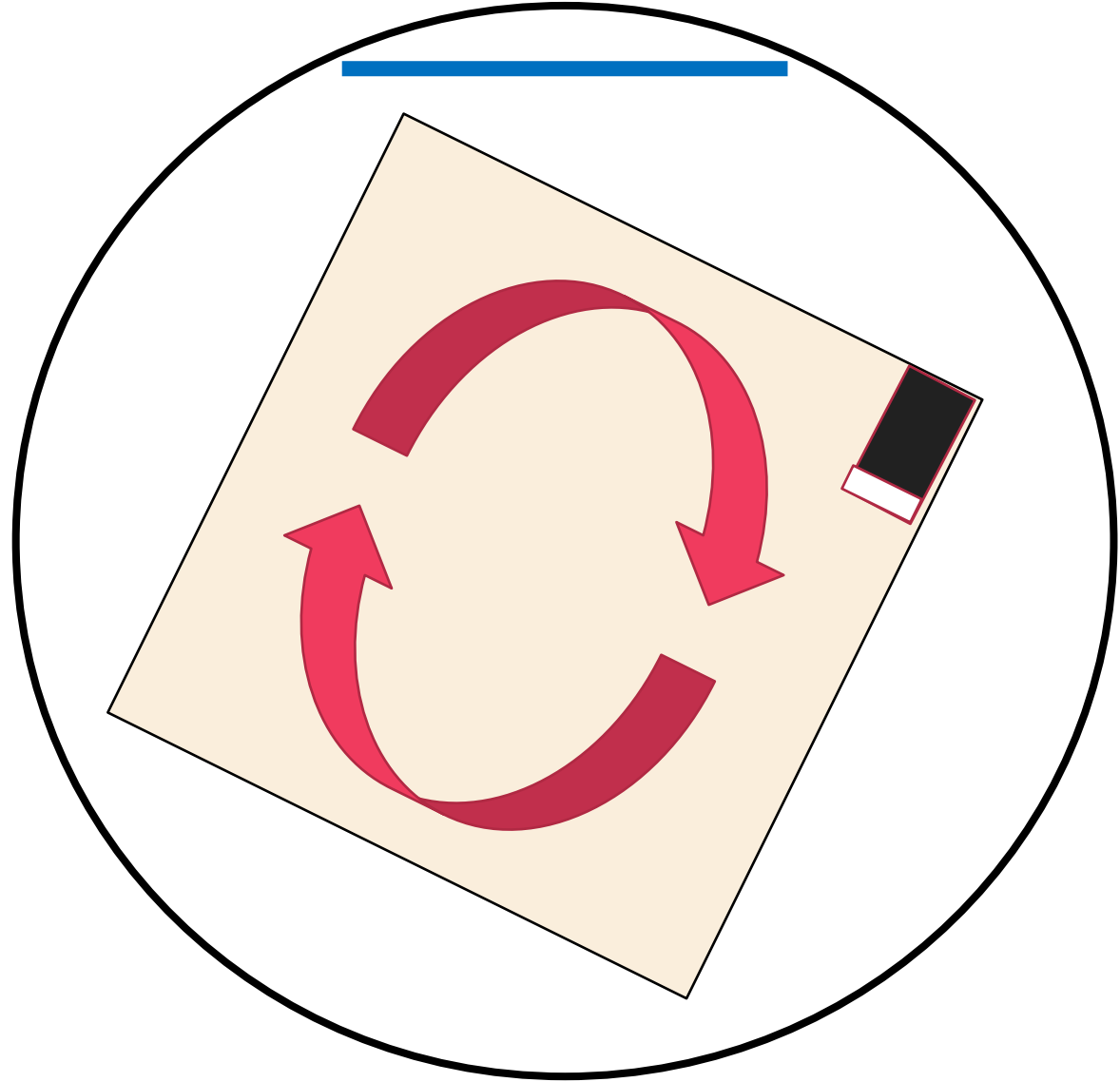








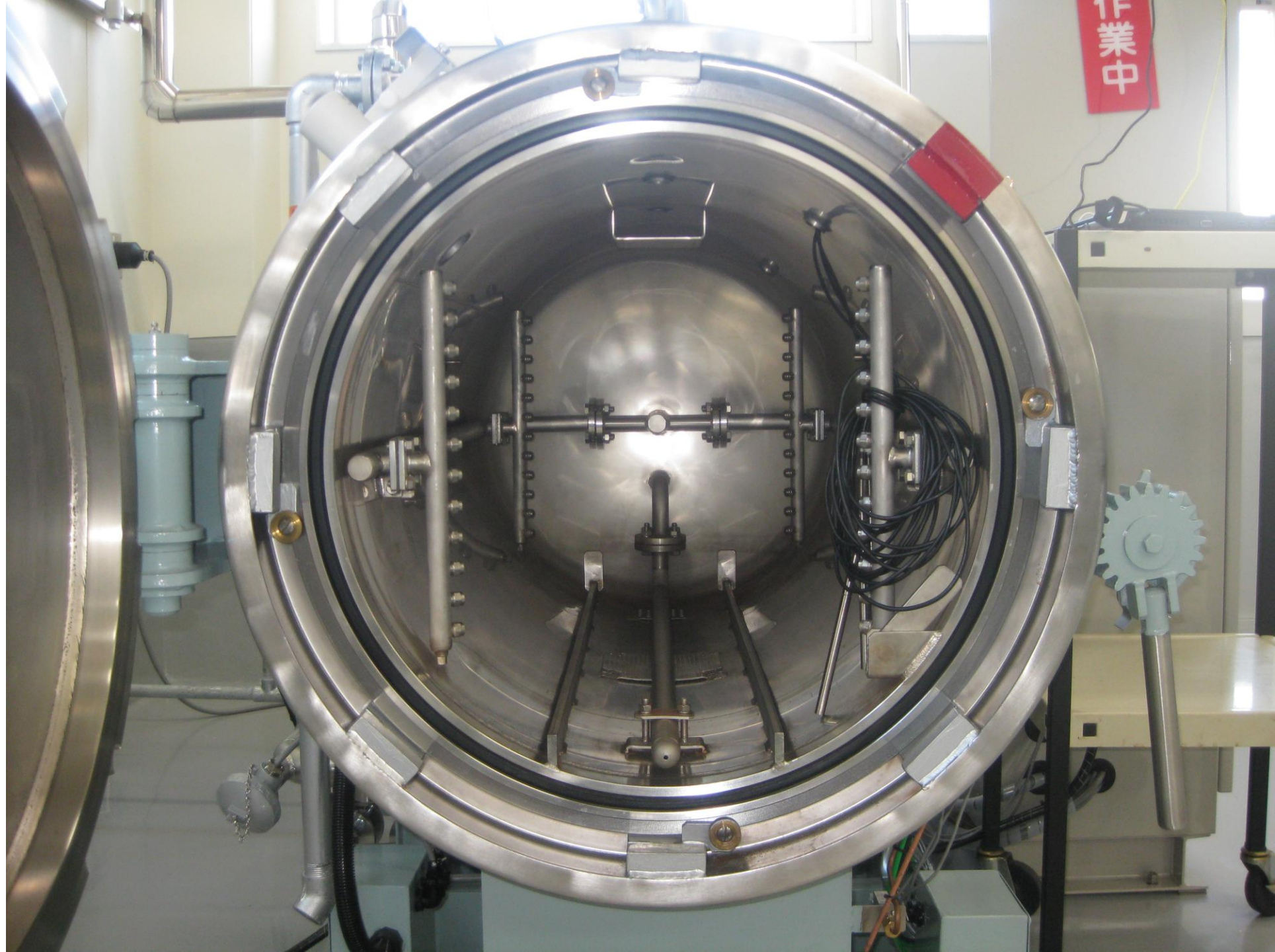




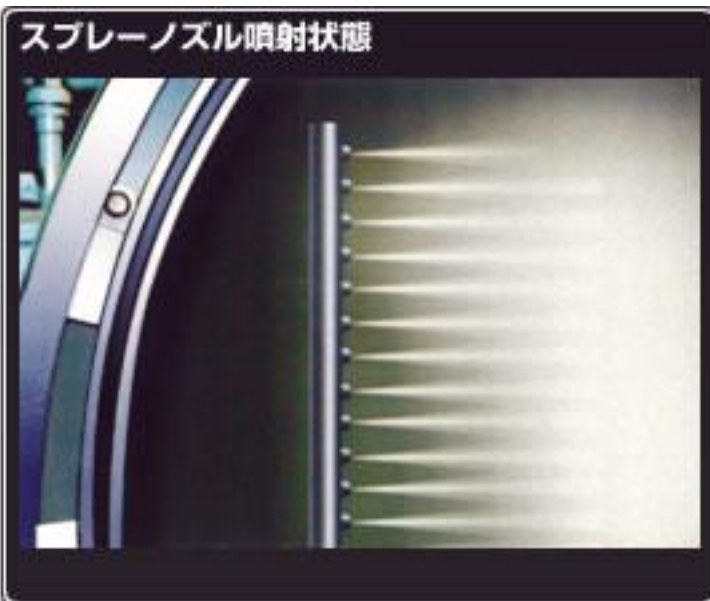
現時点での進化の最終形としての熱水スプレー式



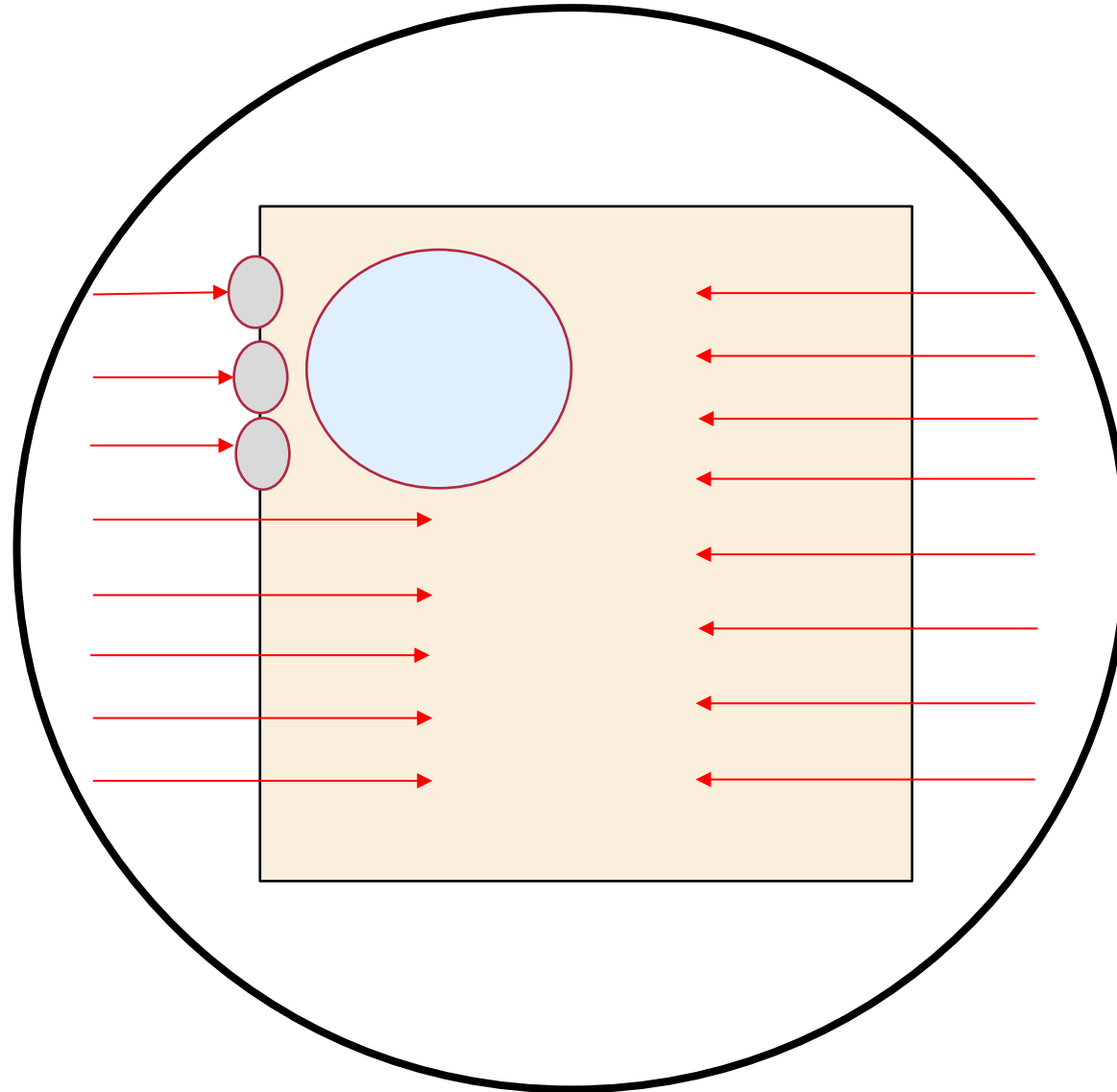
スプレー式



作業中



それでも・・・



単に熱水スプレーというだけでは



商業的無菌性確認は こんなんじゃ「ダメ」

食品（清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品を除く。）を気密性のある容器包装に入れ、密封した後、加圧加熱殺菌したものをいう。

●容器包装詰加圧加熱殺菌食品の微生物検査方法

(1) 恒温試験

検体を容器包装のまま35.0℃で14日間保持する。この間において容器包装の膨張の有無又は内容物の漏えいの有無を観察する。この場合容器包装の膨張の有無は約20℃に冷却して観察するものとし、容器包装の膨張又は漏えいを認めたものは、微生物が陽性であるとみなす。

(2) 細菌試験

1. 試料の調製

検体開封部の表面をアルコール綿でよくふき、滅菌した器具を用いて開封し、その内容物の全部を無菌的に混合した後、その25gを無菌的に採り、滅菌リン酸緩衝希釈水225mLを加えて細砕する。その1mLを滅菌ピペットで滅菌試験管に採り、滅菌リン酸緩衝希釈水9mLを加えてよく混和し、これを試料とする。

2. 試験法

試料を1mLずつ5本のチオグリコール酸塩培養基に接種し、35.0℃で48時間培養する。この場合、培養基のいずれかに菌の増殖を認めたものは陽性とする。

●容器包装詰加圧加熱殺菌食品の微生物検査判定方法

(1)の恒温試験で陰性であった場合に(2)の無菌試験を行う。
どちらも陰性であった場合に、厚生労働省が定める成分規格に合格となる。

商業的無菌性確認は こんなんじゃ「ダメ」

2. 無菌試験の実施例

2-1. 恒温試験（保存試験）

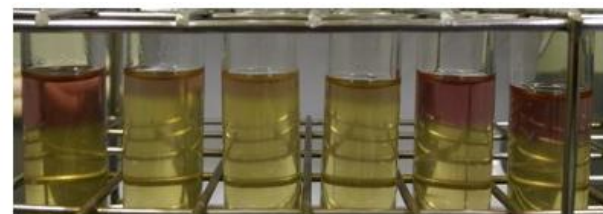
レトルト食品検体Aを容器包装されたままの状態^①で35℃14日間保持した結果、容器膨張や内容物漏洩などの異常は認められず、恒温試験は陰性となりました。

2-2. 細菌試験

保存試験後の検体Aを無菌的に25g採取し、滅菌希釈液で100倍希釈した液をチオグリコール酸（TGC）培地5本に1mLずつ深部から上層部にかけて静かに接種しました。35℃で48時間培養した結果（**図1**）、培養液①～③の上層部が濁り、レサズリン色素の色調が変化したことから好気性菌の増殖が認められ、細菌試験は陽性となりました。このように恒温試験と細菌試験を行い、いずれかで陽性の場合にはレトルト食品の規格に不適となり、製品設計や品質管理を見直す必要があります。

3. 細菌試験で増殖が認められた菌の同定

①～③の上層部を採取し生物顕微鏡で観察したところ、形態の類似した運動性のある桿菌が観察されました。②を標準寒天培地に塗抹し35℃で培養して得られた細菌コロニーを**図2**に示します。これを試料として、食品工業技術センターに導入されたMALDI-TOF MS 微生物同定システム³⁾を用いて分析しました。その結果、99.9%の高いデータ信頼度で *Bacillus sporothermodurans* と推定(同定)されました。この菌名で文献検索したところ、UHT殺菌牛乳やきこの類から分離された株の文献がヒットし、耐熱性や発育温度の情報が得られました。厳密には検体Aから分離した株の性質を調べる必要がありますが、文献の情報を製品設計の見直しや品質管理の参考にすることができます。



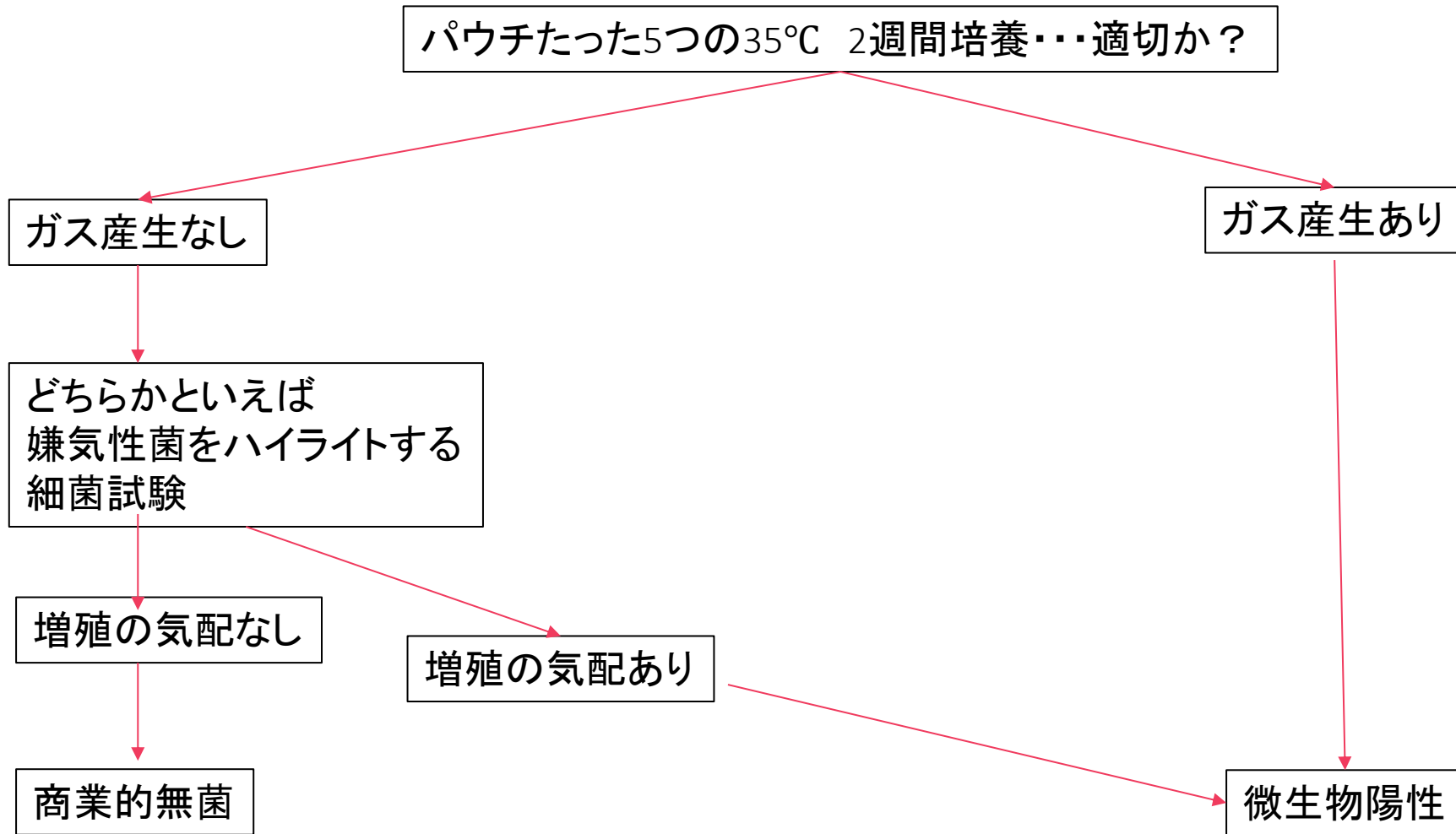
対照* ① ② ③ ④ ⑤
*接種後に殺菌処理したもの

図1 検体Aの細菌試験結果(TGC培地)



図2 培養液②から得られた細菌コロニー

クロストリディウムの多くはガス産生という前提に立つのはいいが



TGC培地は嫌気培養用

アキュディア™ TGC培地 顆粒

AccuDia™ TGC Medium, Fluid

日本薬局方準拠



商業的無菌性確認手順は・・・

- 少量生産しかしない宇宙食の安全性をなんとかのぞき見したいという
妥協の産物
- 大量生産する一般食の1ppm未満の不良率要求を確認するものとしては
全く不十分

バリデーションにはいわゆるヒューマンエラー対象にはっていない



Ninja Tools

安全なもの食べるには？

安全な物を食べるのに知っておきたいニュースの紹介と解説を行っています。

2005年4月18日の @nifty週刊ココログガイドで紹介されました。

Recent Posts

[食品衛生法に基づく安全性審査を控えていなかった遺伝子組換え微生物を利用した添加物についての対応](#)

[牛肉の放射線物質に関する検索システムがスタート](#)

[厚生労働省が「生食用」表示を要請](#)

[厚生労働省が生食用肉に新基準&罰則を設ける方針](#)

[生肉を食べる事の危険性を知る](#)

[白煮や制限を知っていただろうか。](#)

[「アレルギー物質としてバナナを奨励表示 | Main | 残留抗生物質ってなんだろう」](#)

November 17, 2004

レトルト殺菌し忘れた？カレーを回収

[弊社製品回収に係るお詫びとお知らせ](#)

お客様各位

平素は弊社製品にご愛顧を賜り厚くお礼申し上げます。

さてこの度、弊社製造「ビーフカレー辛口」の一部におきまして、工場製造ラインのトラブルのため未殺菌の製品が一部混入し膨張品が発生していることが判明いたしました。膨張品は、内容物の変質しております。また、現在は膨張していない製品でも時間とともに変質し膨張する恐れがございますので下記対象製品を自主回収させていただきます。

お客様各位

平素は弊社製品に格別のご愛顧を賜り厚くお礼申し上げます。

さてこの度、弊社製造「ビーフカレー辛口」の一部におきまして、工場製造ラインのトラブルのため未殺菌の製品が一部混入し膨張品が発生していることが判明いたしました。膨張品は、内容物の変質しております。また、現在は膨張していない製品でも時間とともに変質し膨張する恐れがございますので下記対象製品を自主回収させていただきますこといたしました。

お客様のお手元に当該製品がございましたら、大変お手数とは存じますが、下記の送付先に料金着払いにてお送り下さいます様、お願い申し上げます。後日、製品代金をお送りさせていただきます。

お客様ならびにお得意先様、関係者の皆様には多大なご迷惑とお手数をおかけいたしますことを深くお詫び申し上げますとともに、今後このような事態が再び発生することのないよう品質管理に万全を期す所存でございます。何卒ご理解とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

平成16年11月16日

丸大食品株式会社

1. 対象製品

・ビーフカレー辛口 180g(バーコード 4902715827209)

・ビーフカレーお買得4個パック 辛口(バーコード 4902715828404)

賞味期限 06.10.26C 及び 06.10.26D

2. ご送付先

丸大食品株式会社 お客様相談室

〒569-8577 大阪府高槻市緑町21-3

※ご送付の際は、確実にご手配させていただくため、郵便番号・ご住所・お名前・お電話番号を明記下さいますようお願い申し上げます。

3. お問い合わせ先

丸大食品株式会社 お客様相談室

フリーダイヤル 0120-338845

(受付時間 午前9時から午後6時まで)

◎お客様からご提供いただきました、お名前・ご住所・お電話番号等の個人情報、本件のお問合せ、及びご返金手続きのためだけに利用し管理いたします。

キューピーあえるパスタソース

カルボナーラ

濃厚チーズ仕立て



1人前
×2



キューピー、パスタソースを回収 8296個、未殺菌の袋が膨張

共同通信社 2020/03/24 20:42



キューピーは24日、袋入りパスタソース「キューピーあえるパスタソース カルボナーラ濃厚チーズ仕立て」に、膨張している商品が見つかったとして、8296個を自主回収すると発表した。袋詰めした後の殺菌工程を飛ばすミスがあり、未殺菌の商品が混入した。現時点で健康被害の報告はないが、食べるとおなかを壊す可能性もあるという。

回収対象は賞味期限が2021年2月20日で、製造ロット番号の5桁の数字が23520～31816の商品。青森の工場で2月27日に製造した。問い合わせは通話無料のお客さま相談室「受付センター」、フリーダイヤル(0120) 811399。

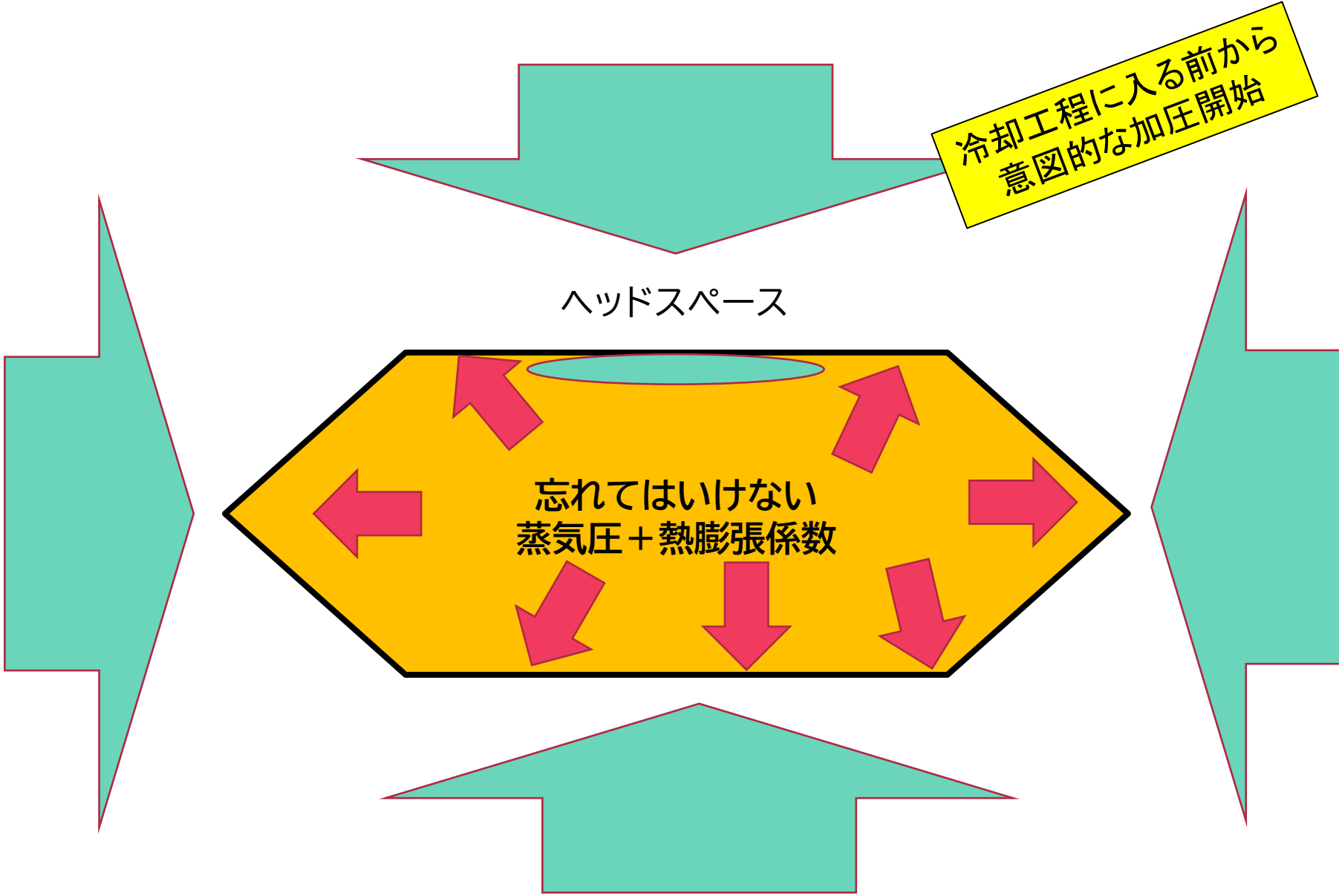
バリデーションで見逃しがちな因子

- ▶耐熱性芽胞が予想以上に強かった（缶コーヒーなどのホットベンダーで発現）
- ▶（増粘多糖類（食物繊維含む）・油分）に取り込まれた菌が 予想以上の耐熱性を示すことがある（缶詰、レトルトカレー）
- ▶薄い沈殿層であっても 熱浸透の阻害をすることがある（缶ココア）
- ▶殺菌前の腐敗（インシピエントスポイラージと呼ぶ）が起きていた・・・ヒスタミン
- ▶レトルトではないが 連続殺菌機での黄色ブドウ球菌毒素残留、育児乳でのセレウリド

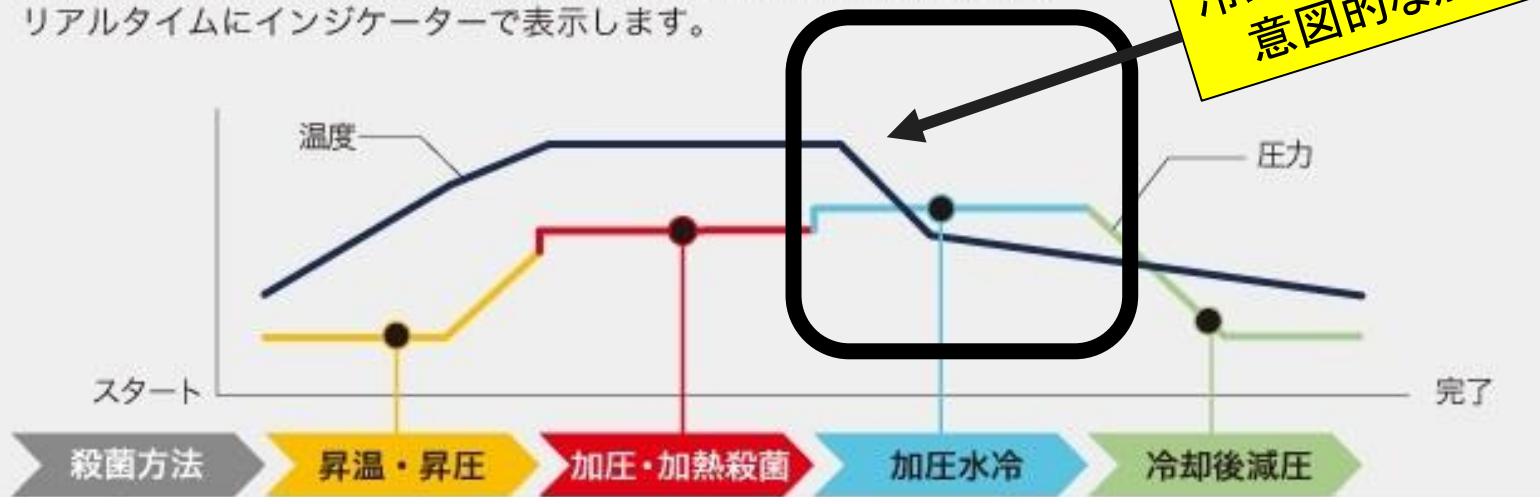
冷却工程に入る前から
意図的な加圧開始

ヘッドスペース

忘れてはいけない
蒸気圧 + 熱膨張係数



設定条件に従い自動運転を行います。なお各工程の運転確認用としてリアルタイムにインジケータで表示します。



冷却工程に入る前から意図的な加圧開始

「蒸気式」
「熱水式」
任意で選択

缶体内の
水量を
変えるだけ！

140°C

温度使用範囲
100~140°C
含気した状態でも
温度設定が可能。



含気加圧調整
破袋防止のため
レトルトパウチの
外側から圧力を
かけます。

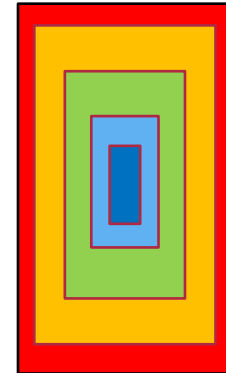


加圧冷却方式

急激な圧力・温度変化の影響を受けやすい
レトルト食品に対して、破袋を防止しながら
食味の低下を抑えます。

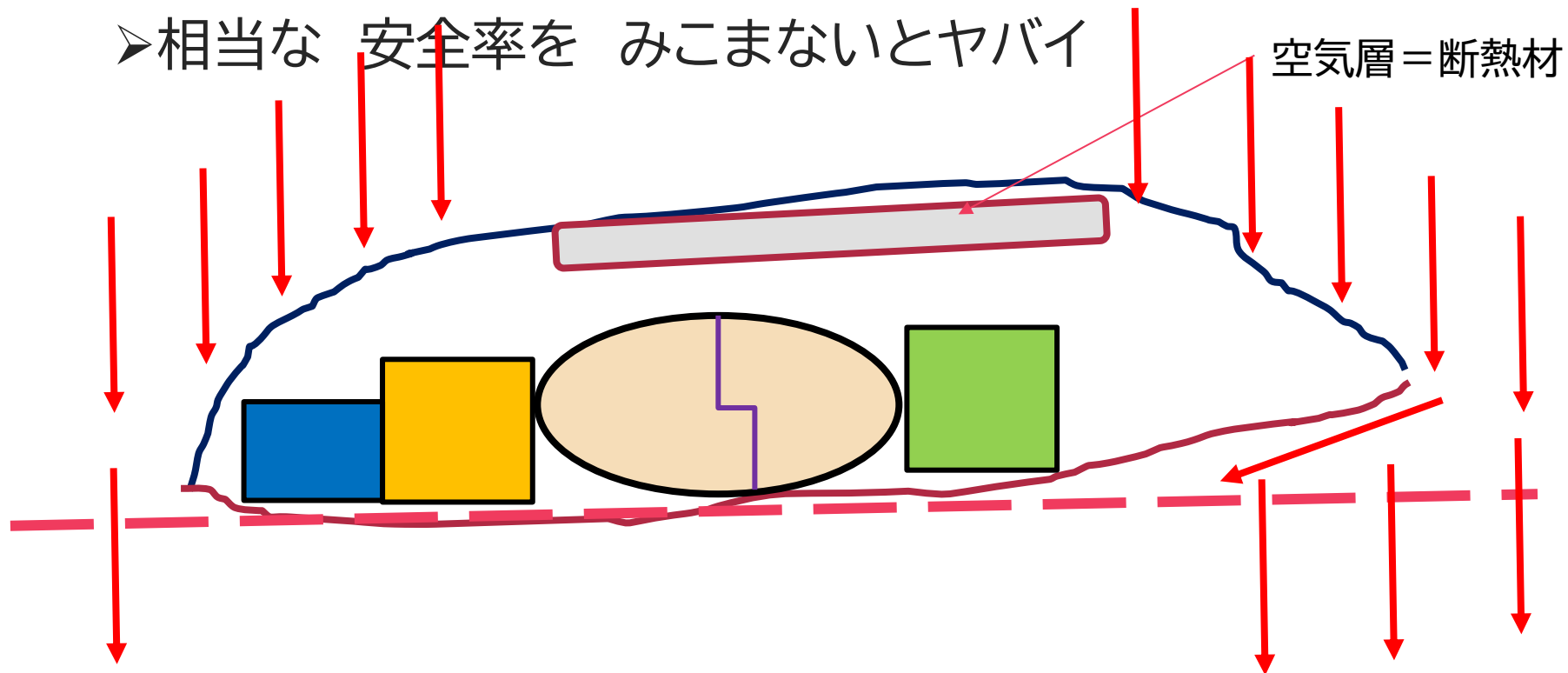
熱浸透検証

- 流動物 固形物 その混合物で 熱浸透の挙動はことなる
- ここまでなると個別での相談を



パウチに入った「おでん」

- 気軽に生産されているが…
- 一般に想像されているよりも なかなかの難題
- 相当な 安全率を みこまないとヤバイ



クックバリューという考え方

- F値と極似、Dとzを変えるだけ
 - 熱による細菌の殺滅ではなく
 - 熱による品質劣化の指標(時には品質向上の指標)
 - クッキング(調理)効果の目安
 - しかし ことが官能的な評価なので 自分たちで この特徴のこれだけの変化には 何°Cで何分のクッキングが必要、それが 何°Cだったらどれだけ変化するという事前調査を必要とする
- 嗜好がことなるので 外国のクックバリューはあてにならない

TAKE HOME MESSAGE



レトルトのバリデーション

- 中身も包材も一気に という点では単純明解
- しかし中身の熱劣化が激しいので殺菌価とのバランスを要する
- 包材の虐待が「すごい」
- バイオフィルムの問題まで入れるとバリデーションの期間は長くなりがち

アセプティックのバリデーション

アセプティック製品とは

アセプティック製品の定義

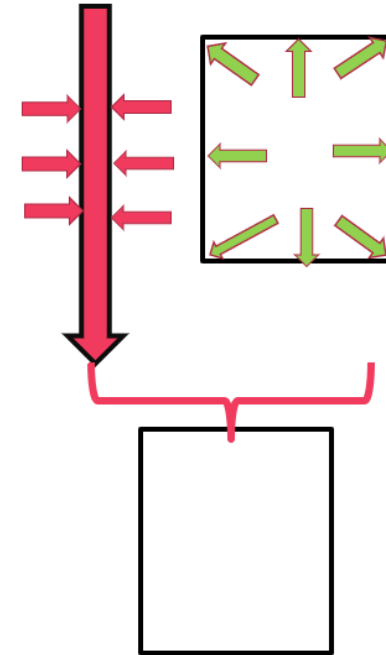
製品・容器・充填環境をそれぞれ個別に無菌化し、無菌状態で充填・密封する食品製造方式です。レトルト殺菌とは異なり、各構成要素に独自のバリデーションが求められます。

主な構成要素

- UHT（超高温瞬間殺菌装置）
- 包材内面の滅菌装置
- アセプティックタンク（バッファー機能）
- 充填機（無菌性維持しながら充填）

アセプティックとは…

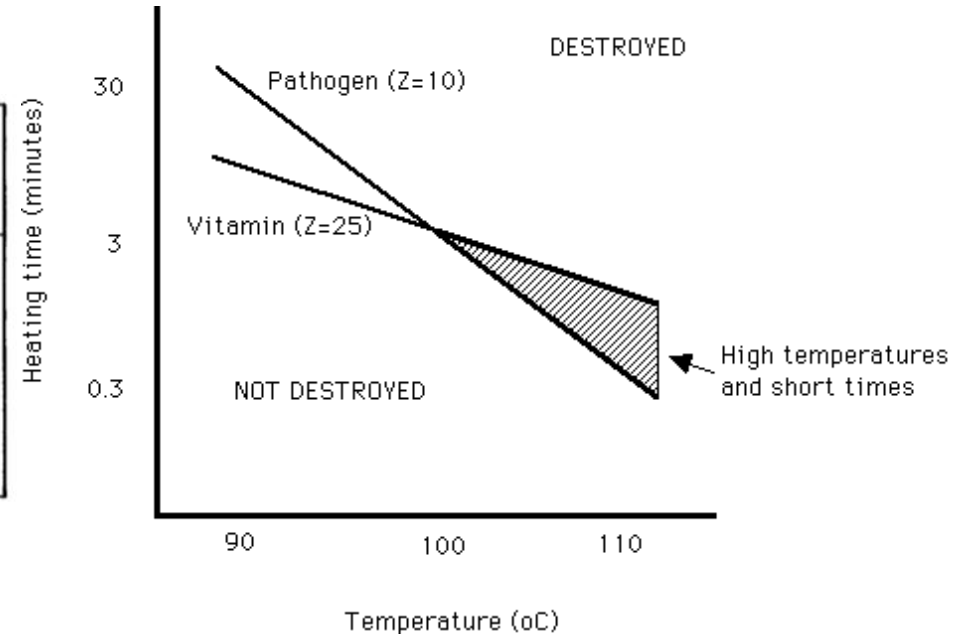
- 連続殺菌機を通じての「製品の滅菌」
- 薬剤殺菌を通じての「包材の滅菌」
- 熱または薬剤を介しての「装置の滅菌」
- 無菌空気を供給しての「装置の滅菌」状態維持

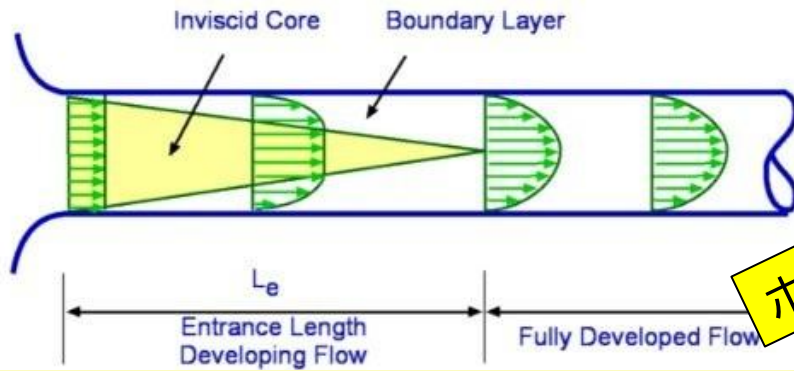


上四つが すべてうまくいって初めて成立

なぜ高温短時間殺菌の方好まれるか？

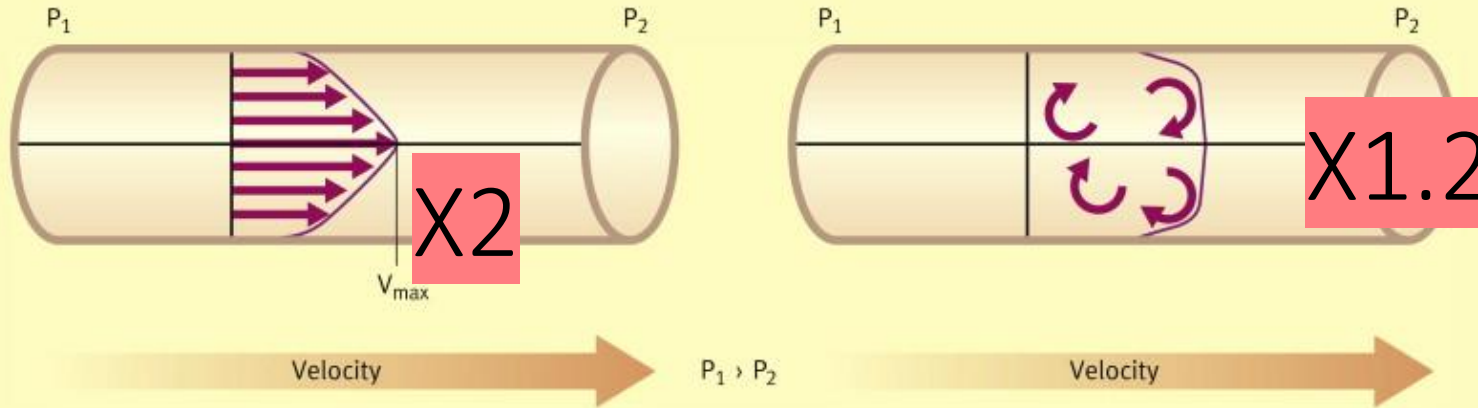
| Phenomenon | z (°C) |
|------------------------------------|--------|
| heat denaturation of whey proteins | 7 |
| Bacillus stearothermophilus spores | 10 |
| Maillard reaction | 13,5 |
| heat denaturation of Casein | 25 |





ホールディングチューブには安全係数を

Laminar and turbulent flow



During laminar flow (smooth, steady flow) the flow profile is parabolic, with the fluid travelling most quickly at the centre of the tube and not moving at the edges of the tube. During turbulent flow (fluctuating and agitated flow) the flow profile is essentially flat, with all fluid travelling at the same velocity except at the tube edges where flow velocity is zero.



ホールディングチューブには安全係数を

ホールディング
チューブの
狭窄

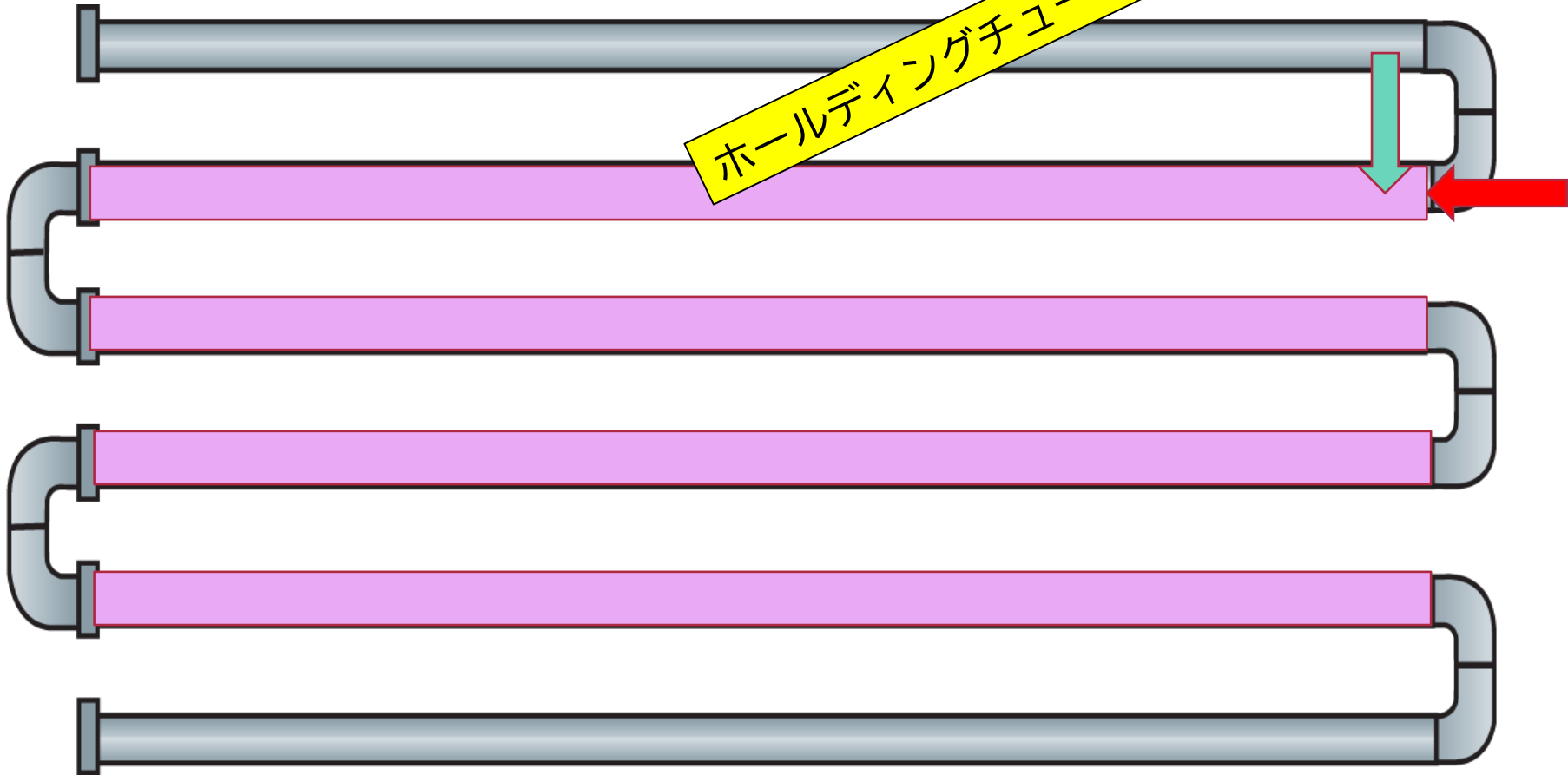


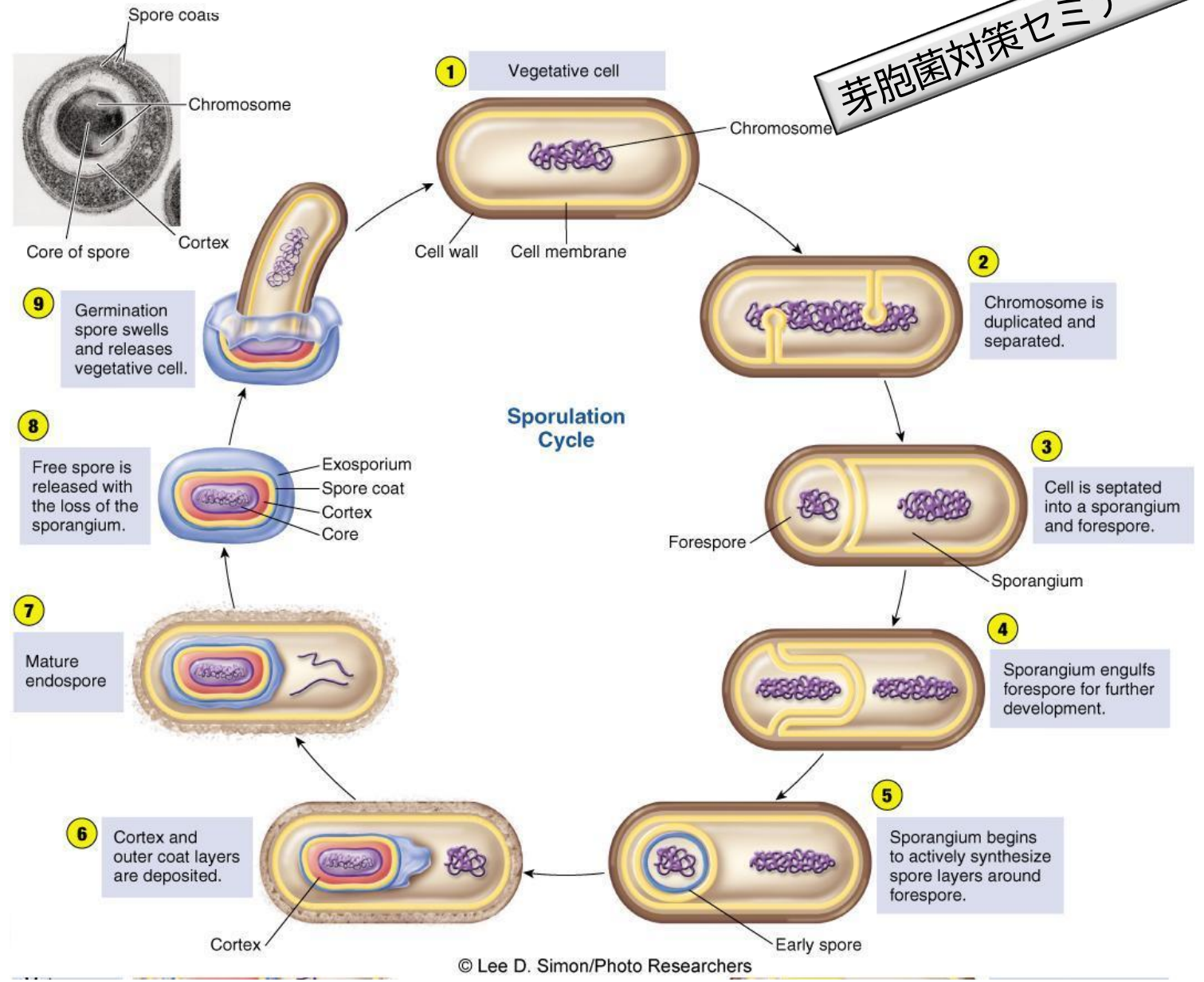
ホールディングチューブ内
での気泡発生



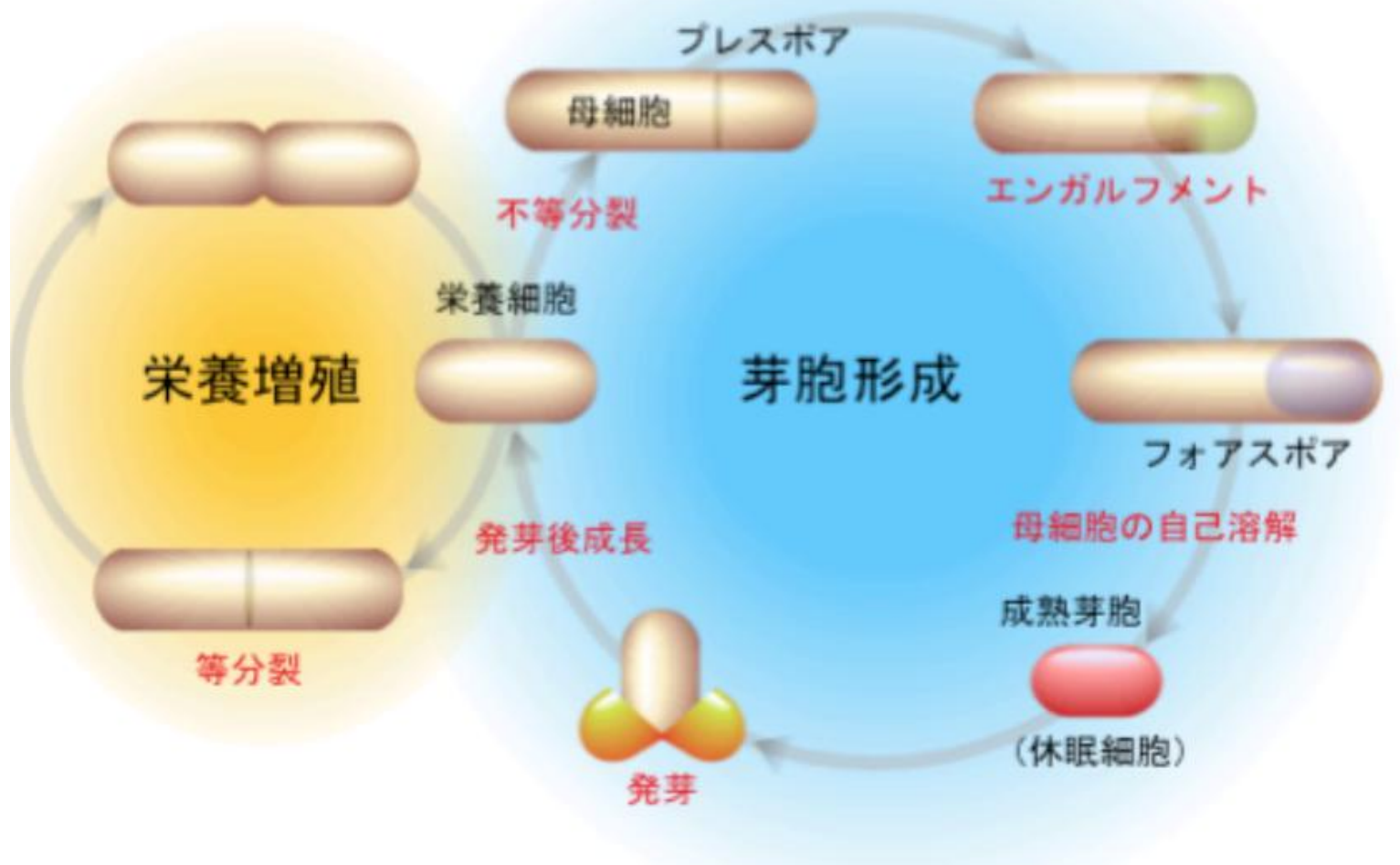
120

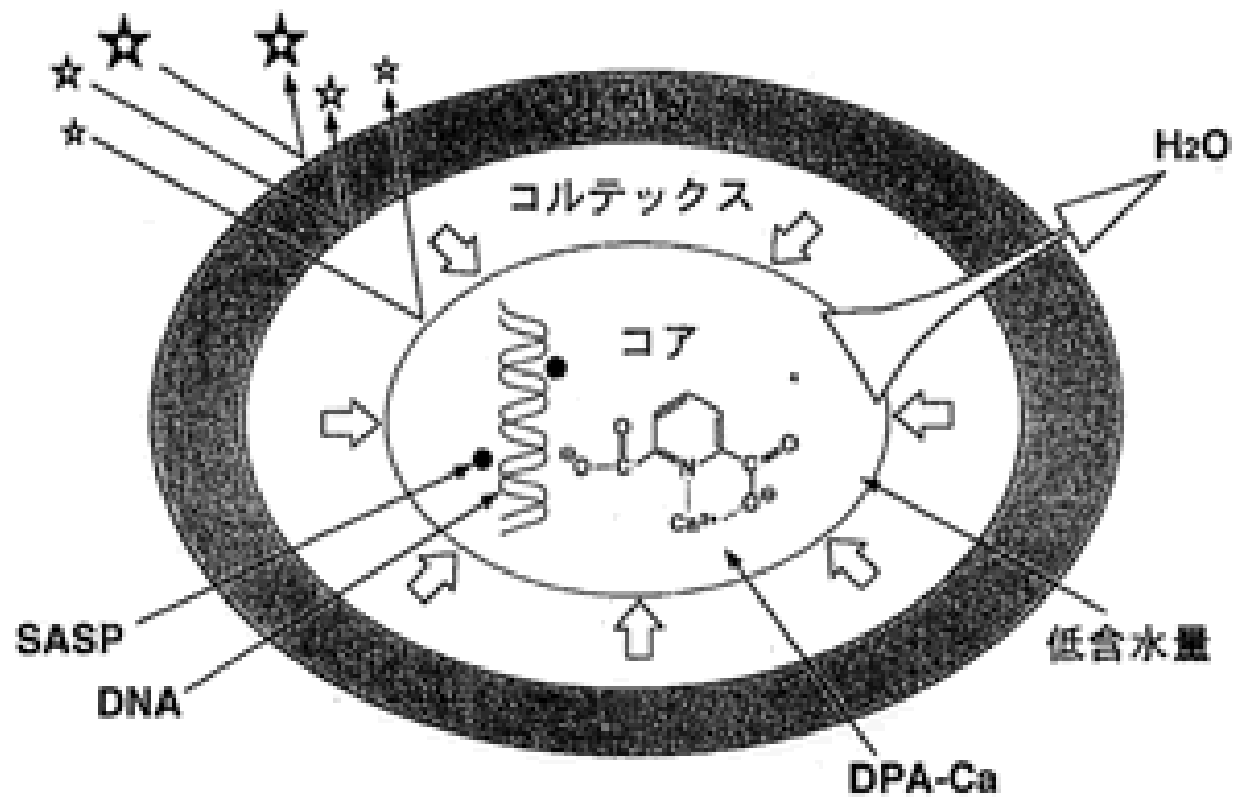
ホールディングチューブには安全係数を





芽胞菌のライフサイクル





芽胞抵抗性模式図

<https://www.th-owl.de/fb4/ldzbase/>

The screenshot shows a web browser window with the URL <https://www.th-owl.de/fb4/ldzbase/>. The page features a header with the title "Lemgo D- and z-value Database for Food" and "LDz-Base" in red and black text. Logos for "ILT.NRW INSTITUT FÜR LEBENSMITTELTECHNOLOGIE" and "TH OWL TECHNISCHE HOCHSCHULE OSTWESTFALEN-LIPPE UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES AND ARTS" are displayed. A navigation bar includes links for "Home", "New search", "History", "About us", and "Contact". The main content area is titled "Welcome to the Lemgo D- and z-value Database for Food 1.1 LDz-Base" and contains several paragraphs of text describing the database's purpose and usage. A search box labeled "Find your data now" is located at the bottom left. The footer contains copyright information "© Thomas Althoff, 2006, Knut Schwarzer, 2007" and links for "Privacy / Terms of use" and "Imprint".

**Lemgo D- and z-value Database
LDz-Base for Food**

→ Home → New search → History → About us → Contact

**Welcome to the Lemgo D- and z-value Database for Food 1.1
LDz-Base**

The Lemgo D- and z-value Database for food is a project of the Institute for Food Technology.NRW (ILT.NRW) at the OWL University of Applied Sciences and Arts. More information about the involved departments you can find → here.

While installing a new food product line you always have to put a lot of effort in research finding the right parameters for sterilization of the ingredients or of the final product. Although in literature a lot of data are available in a certain case it is difficult to find matching D-values.

In this database you will find the parameters needed to design your pasteurization or sterilization project. While we are collecting all sorts of D- and z-values describing the characteristics of thermal death, at the moment our main focus is on beverage spoiling microorganisms. With each D-value you will find information about parameters known to have an effect on these like pH-, Brix- and aw-value. The data are sorted by the species of microorganism and their medium.

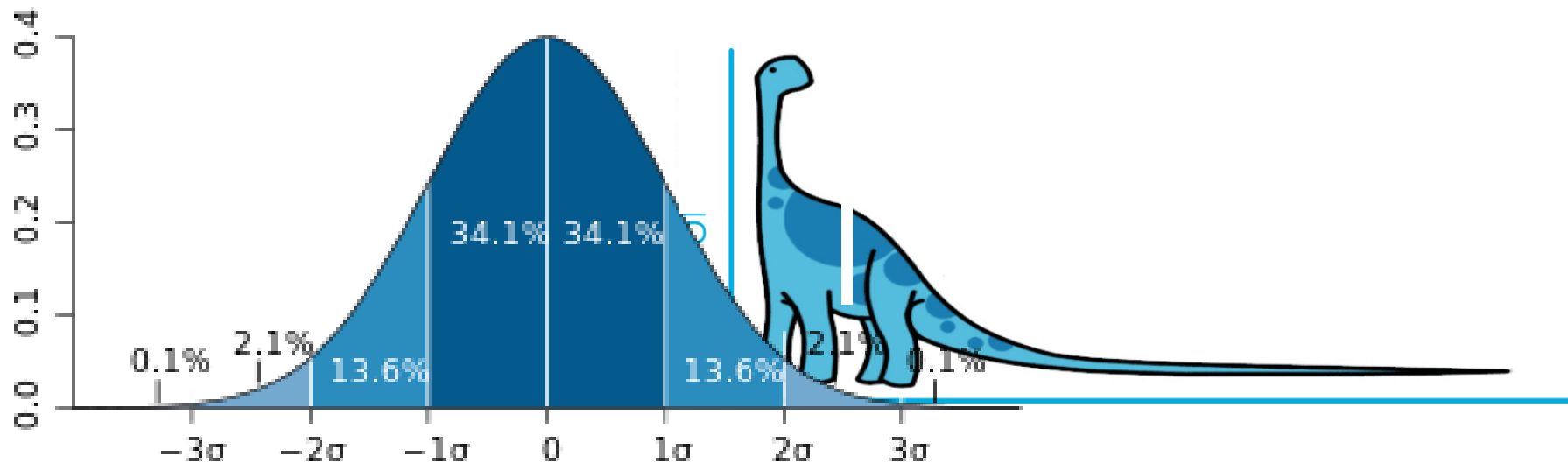
To complete our product additional information e.g. about the experiments the data was derived from or cluster of relevant data are given. Using this information you not only have the opportunity to optimize parameters of your current workflow, but you can estimate how your workflow will react to changes in certain parameter.

If you are interested in older versions of the Database have a look in our → history.

Find your data now

© Thomas Althoff, 2006, Knut Schwarzer, 2007 → Privacy / Terms of use → Imprint

全ての微生物が・・・熱耐性については
ロングテイル=Long Tail
を示す傾向にある。とくにUHT！



アセプティック製品側検証

- ▶ ホールディングチューブの長さ計算に「安全率」を
FDAだと最低でも20%
- ▶ 高温短時間殺菌の場合 ロングテイルが深刻な形
食中毒菌対象で3~4D, 5D, 12D
変敗菌の方が はるかに耐熱性

アセプティック包材側検証

- 日本にはガイドラインがない
- 海外では 指標菌を用いて 3~4D
- 滅菌試験を開始する前に 密封性の確立を



Institute For Thermal Processing Specialists

Document G.005.V1

**GUIDELINES FOR MICROBIOLOGICAL VALIDATION OF THE
STERILIZATION OF ASEPTIC FILLING MACHINES AND
PACKAGES, INCLUDING CONTAINERS AND CLOSURES**

6.7. Determination of Microbiological Challenge Locations for the Packaging Material Sterilization

6.7.1. Depending on the technological solution adopted by the manufacturer, the packaging material may first be sterilized and then aseptically formed into packages, the packages may be formed under non-aseptic conditions and then be sterilized, or the packaging material can be pre-sterilized.

6.7.1.1. Every spot on the surface of the packaging material or a preformed package may not receive the same sterilization.

6.7.1.2. There may exist one or more spots on the surface of the packaging material, the “weakest point,” that is likely to receive the least sterilization dose.

6.7.1.3. With the aid of physical, chemical and geometrical considerations, including fluid-dynamic modelling, the package or packaging material should be “mapped” to determine the weakest points.

6.7.1.4. In principle, the microbiological validation could concentrate only on the weakest points, but it is advisable to challenge several spots to confirm that the weakest spots have been correctly chosen.

6.9. Develop a Protocol for Validation Testing

6.9.1. Test Methodologies for Microbiological Validation of Sterilization Processes

- 6.9.1.1. In general, microbiological validation provides evidence that the processes applied for machine and package sterilization deliver a LCR higher than a stated target value for a suitable test organism.
- 6.9.1.2. There are a variety of test methods that may be used for microbiological validation of any sterilization process. References are available that provide more detail on these methods. Generic information is provided in this document for the most common microbiological validation test methods.
- 6.9.1.3. Count Reduction Test – The Count Reduction test is based on knowing the initial count on the inoculated carrier/substrate and then recovering and enumerating the number of microorganisms that have survived the sterilization process. This method requires the presence (recovery) and enumeration of surviving test microorganisms. The experiment should be designed so that the colony forming units are in the countable range when the target LCR is achieved. Absence of surviving organisms indicates that the target LCR has been exceeded.

6.9.1.4. End Point Test – The End Point test is based on exposing inoculated carriers/substrates with known initial counts to the sterilization process, incubating the carriers/substrates using appropriate methods (e.g., media and growth temperature) and observing for growth of surviving microorganisms. A binary response—growth or no growth—is obtained, where “no growth” implies sterility of the sample. Estimation of mean survivor load is done using statistical tools when several replicate samples are available, some of which show growth. This method can also be applied to a single inoculated sample; in that case, no growth (sterility) of the sample is required for the test to be considered successful though the uncertainty associated with the binary information should be taken into account.

6.9.2. Identifying the Target Organism and the Target Log Reduction

- 6.9.2.1. The purpose of microbiological validation is to demonstrate that commercial sterility is achieved.
- 6.9.2.2. The identity of the target organism for the specific sterilization process and the required logarithmic cycle reduction must be determined, justified and documented.
- 6.9.2.3. The target organism is the pathogenic microorganism of public health concern that is most resistant to the specific sterilization process being employed.
 - 6.9.2.3.1. *Clostridium botulinum* has historically been considered the target organism for sterilization by moist heat, dry heat, and peroxide sterilization technologies.
 - 6.9.2.3.2. For some sterilization technologies, more than one target organism may also have to be considered, for example, *Bacillus cereus*.

| Sterilization Process | Common Surrogate Microorganisms | Comments |
|---|---|---|
| Saturated Steam/ Superheated Water | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Clostridium sporogenes</i> - <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <p>This sterilization process is unlikely to apply to the aseptic filler. Product pathway is a possible exception. Use of <i>G. stearothermophilus</i>, a thermophilic microorganism, is advantageous in that it eliminates and/or reduces the need for aseptic technique when recovering exposed carriers.</p> |
| Superheated Steam & Dry Heat | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Geobacillus stearothermophilus</i> - <i>Bacillus polymyxa</i> - <i>Bacillus atrophaeus</i>[†] | <p>Microorganisms listed are used when mode of microbiological inactivation is dry heat.</p> |
| Hydrogen Peroxide + Heat | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus atrophaeus</i>[†] - <i>Bacillus subtilis</i> | |
| Hydrogen Peroxide + UV | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus atrophaeus</i>[†] - <i>Bacillus subtilis</i> | |
| Peroxyacetic Acid | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus atrophaeus</i>[†] - <i>Bacillus subtilis</i> SA 22 | <p>It is customary to use spores of these organisms when testing the effectiveness of packaging sterilization devices utilizing PAA (VDMA, 1997). No generally accepted surrogate organism has yet to be identified for compliance with US FDA regulations.</p> |

IVLV

Industrievereinigung für
Lebensmitteltechnologie
und Verpackung e.V.



**VDMA-Documents
Food Processing Machinery
and Packaging Machinery**

Code of Practice

**Testing the Effectiveness of Aseptic
Plants Fitted with Packaging Sterilization
Devices**

Contents

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 3 |
| 2. TERMS..... | 4 |
| 3. SPECIFICATION OF TEST MICROORGANISMS FOR CHECKING PACKAGING STERILIZATION DEVICES IN ASEPTIC FILLING MACHINES..... | 4 |
| 3.1 STERILIZATION BY MEANS OF HYDROGEN PEROXIDE | 4 |
| 3.2 STERILIZATION BY MEANS OF STEAM..... | 5 |
| 3.3 MEDIA FOR SUSPENDING SPORES..... | 5 |
| 4. METHODS FOR INOCULATING THE PACKAGING | 5 |
| 4.1 SPRAYING..... | 5 |
| 4.2 APPLICATION BY PIPETTE | 5 |
| 5. COUNT REDUCTION TEST..... | 6 |
| 5.1 GENERAL PROCEDURE | 6 |
| 5.2 TEST METHOD | 6 |
| 6. END-POINT TEST | 7 |
| 6.1 GENERAL PROCEDURE | 7 |
| 6.2 TEST METHOD | 7 |
| 7. TEST REPORT | 8 |
| 8. USE OF THE CODE OF PRACTICE FOR CHECKING NONASEPTIC FILLING MACHINES FITTED WITH DEVICES FOR PACKAGING STERILIZATION..... | 8 |
| 9. REFERENCES..... | 8 |
| 10. STANDARDS CITED | 9 |
| APPENDIX I TEST MICROORGANISMS FOR ASEPTIC PLANTS | 10 |
| APPENDIX II COUNT REDUCTION TEST - WORKED EXAMPLE | 11 |
| APPENDIX III END-POINT TEST - WORKED EXAMPLE..... | 12 |
| APPENDIX IV CULTURE CONDITIONS FOR THE TEST STRAIN BACILLUS SUBTILIS SA 22 AND PREPARATION OF THE SPORE SUSPENSION..... | 13 |

5.2 Test method

- i) Investigation of the critical process parameters prior to the test run is recommended (e.g. concentration of the hydrogen peroxide, temperatures)
- ii) Provision of at least 25 packaging units⁷ which for the test have been inoculated under the same conditions. Each packaging unit has an initial microorganism count of at least 10^5 spores for the test.
- iii) Determination of the initial count IC for 5 artificially infected packaging units from ii). To get out the microorganisms from the inner surface of the containers, they are rinsed with a test medium. On sheet packaging the microorganisms are removed by swabs in accordance with DIN 10113-2. Determination of the recovery rate RR in accordance with the following formula:
$$RR = 1/5(\sum(IC_i/IC)) * 100$$

IC_i: empirically determined initial count for packaging unit i; i = 1, ..., 5
IC: theoretical initial count.
- iv) Setting of the specified machine parameters. It is advisable for the machine manufacturer and the machine operator to jointly agree the parameters.
- v) Introduction of at least 20 infected packaging units into the filling machine. In multiline filling machines the infected packaging units have to be uniformly distributed across the individual lines with the filling line to be mentioned on the individual packaging units. When there are more than 2 lines it has to be ensured that at least 10 packaging units can be investigated on each line. The total number of packaging units to be introduced has to be correspondingly increased.

- v) Introduction of at least 20 infected packaging units into the filling machine. In multiline filling machines the infected packaging units have to be uniformly distributed across the individual lines with the filling line to be mentioned on the individual packaging units. When there are more than 2 lines it has to be ensured that at least 10 packaging units can be investigated on each line. The total number of packaging units to be introduced has to be correspondingly increased.
- vi) Carrying out the test run. If possible the packaging units should be filled during the test run to 25 % of the nominal filling volume with sterile skimmed milk cooled to room temperature or a sterile, pipettable or filterable liquid. The packaging units are to be cooled immediately after filling. The test data are then documented.
- vii) If during the test run the packs are not filled with a test medium the sterilized packaging units are to be passed on as quickly as possible after the test run for microbiological analysis in order to avoid falsification of the test results.⁸
- viii) Determination of the survivor count (SC) for each of the artificially infected packaging units.
- ix) Calculation of the microorganism count reduction (for worked example see Appendix II).

Code of Practice Testing the Effectiveness of Aseptic Plants Fitted with Packaging Sterilization Devices

$$\begin{aligned} \text{Mean logarithmic count reduction} &= \\ \log(\text{Initial count}) - \log(\text{Final count}) &= \\ \log(IC) - \log\left[\frac{1}{PU} \sum SC_j \cdot 100 / RR\right] \end{aligned}$$

PU: Total number of artificially infected packaging units examined

In the case of multiline filling machines analysis of the results from the individual lines is recommended.

x) The test yields a positive result when for each line investigated at least the mean count reduction previously set is achieved.

6.1 General procedure

In the end-point test the packaging is also artificially inoculated with test microorganisms as in the count reduction test but in this case in three graduated infection stages each being greater by a power of ten than the one before.

The main difference with respect to the count reduction test is that in the end-point test the artificially infected packaging is filled with a sterile culture medium matched to the test microorganism and after an incubation phase only the number of unsterile packaging units is determined. Beyond the effectiveness of the packaging material sterilization the end-point test provides information about the entire process from supplying the product and filling through recontamination-free closure of the packs.

6.2 Test method

- i) Performance test using packaging units which have not been artificially infected⁹ (optional).
- ii) Provision in each case of at least 100 packaging units selected for the test each unit having an initial microorganism count of 10^2 , 10^3 or 10^4 spores of the test microorganism.^{10, 11}
- iii) Uniform distribution of the packaging units over the packaging lines in the case of multiline filling machines.
- iv) Setting of the predetermined machine parameters. It is advisable for the machine manufacturer and the machine operator to jointly agree the parameters.
- v) Test run using the test medium (e.g. sterile skimmed milk or a culture medium matched to the test microorganism). Incubation of the closed packs (at least one week at 30 °C)¹². The number of unsterile packs is then determined. Unsterile packs are to be investigated with regard to the microorganisms which occur.¹³
- vi) Determination of the mean logarithmic count reduction for each of the three levels of contamination according to the following formula¹⁴ (for worked example see Appendix III):

Mean logarithmic count reduction =
log (Initial count per pack) – (log In (Number of packs tested/Number of sterile packs))

- vi) The test yields a positive result when at least the previously established value for the mean count reduction is achieved for each test series.

アセプティック装置側検証

- 日本にはガイドラインがない
- 海外では 指標菌を用いて 3~4D



VDMA - Documents
Food Processing Machinery and Packaging Machinery

Code of Practice

**Testing Aseptic Plants: Sterilizing the
Sterile Zone in a Machine Interior**

4.2 Test method

- i) Prior to the test the points in the sterile zone of the machine interior relevant for sterilization and hence to be checked have to be identified. In doing so the involvement of the machine manufacturer is advisable.
- ii) Preparation of the required numbers of test strips respectively inoculated with 10^5 , 10^4 and 10^3 microorganisms (for instructions see Appendix II).
- iii) Introduction of the test strips into the clean and dry machine paying particular attention to the relevant positions for sterilization identified under i).

Appendix I

Test microorganisms for aseptic plants

Survey by Bernard et al. (1990)

| Sterilization method | Test microorganism |
|--------------------------------------|---|
| Superheated steam | Bacillus stearothermophilus B. polymyxa |
| Dry heat | B. stearothermophilus |
| H ₂ O ₂ + heat | B. subtilis A or B. subtilis var. globigii |
| H ₂ O ₂ +UV | B. subtilis A. |
| Heat of formation | B. stearothermophilus |
| Gamma radiation | B. pumilus |
| Wet heat | B. stearothermophilus Clostridium sporogenes |

アセプティックタンク、パイプラインなどは 通常
(蒸気・熱水などでの)湿熱滅菌

蒸気や熱水で洗い流されてしまう為
Geobacillus stearothermophilus 芽胞を塗
り付けたストリップテープなどは 役に立たない

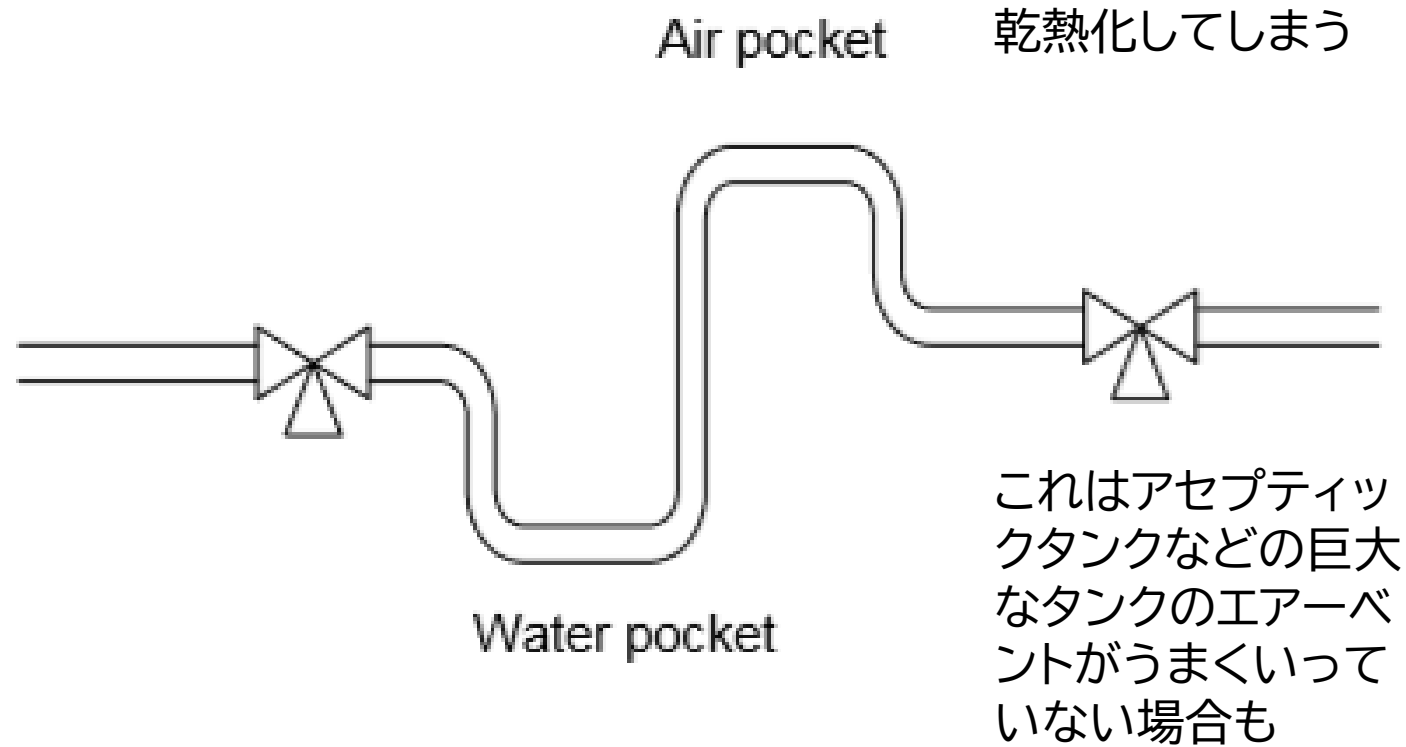
そのため 単純な「最冷点」または「空気だまり」「ドレン
だまり」あるいは「汚れの落ちにくい箇所」での 内部あ
るいは表面の温度履歴のみで妥当性確認とすることが
多い・・・しかし・・・



**VDMA-Documents
Food Processing Machinery
and Packaging Machinery**

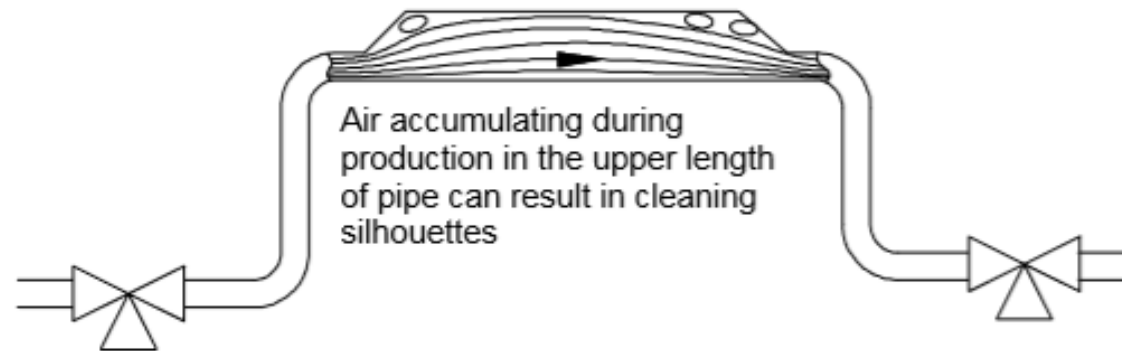
**Aseptic Production Lines:
Unsterility Risks in Product and Feed
Lines
- Planning and Installation Faults**

3.1 Case study: “Liquid and air pockets”



3.3 Case study: “Cleaning silhouette”

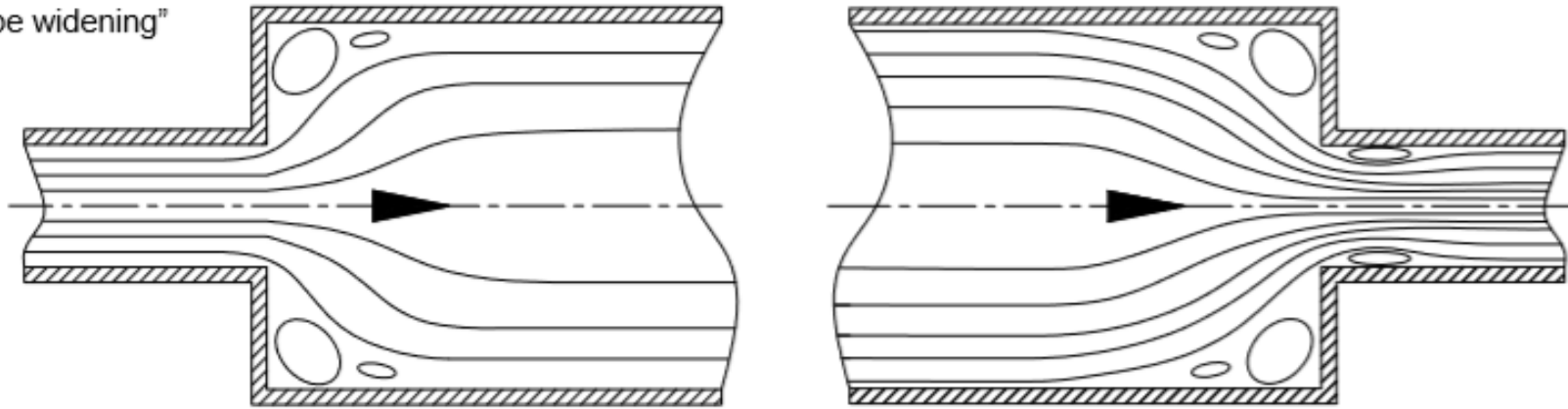
In a length of pipe of relatively large cross section which is filled at the start of production an air pocket forms during production due to outgassing from the product. This can give rise to “cleaning silhouettes” during cleaning.



3.4 Case study: “Change in pipe cross section”

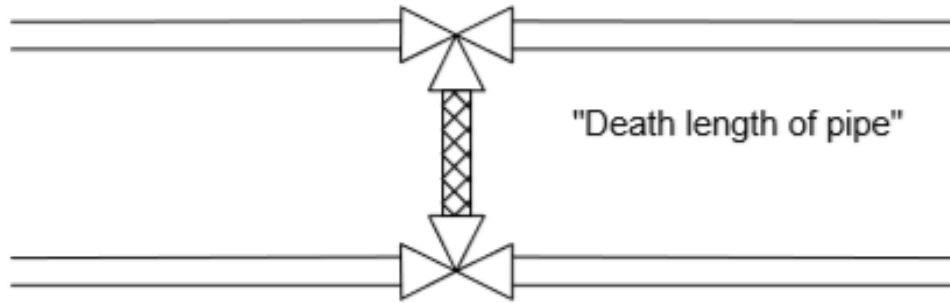
When narrowing or widening of a pipe is incorrectly carried out water pockets or air bubbles may form. There is the risk of cleaning silhouettes in zones of low turbulence.

“Pipe widening”



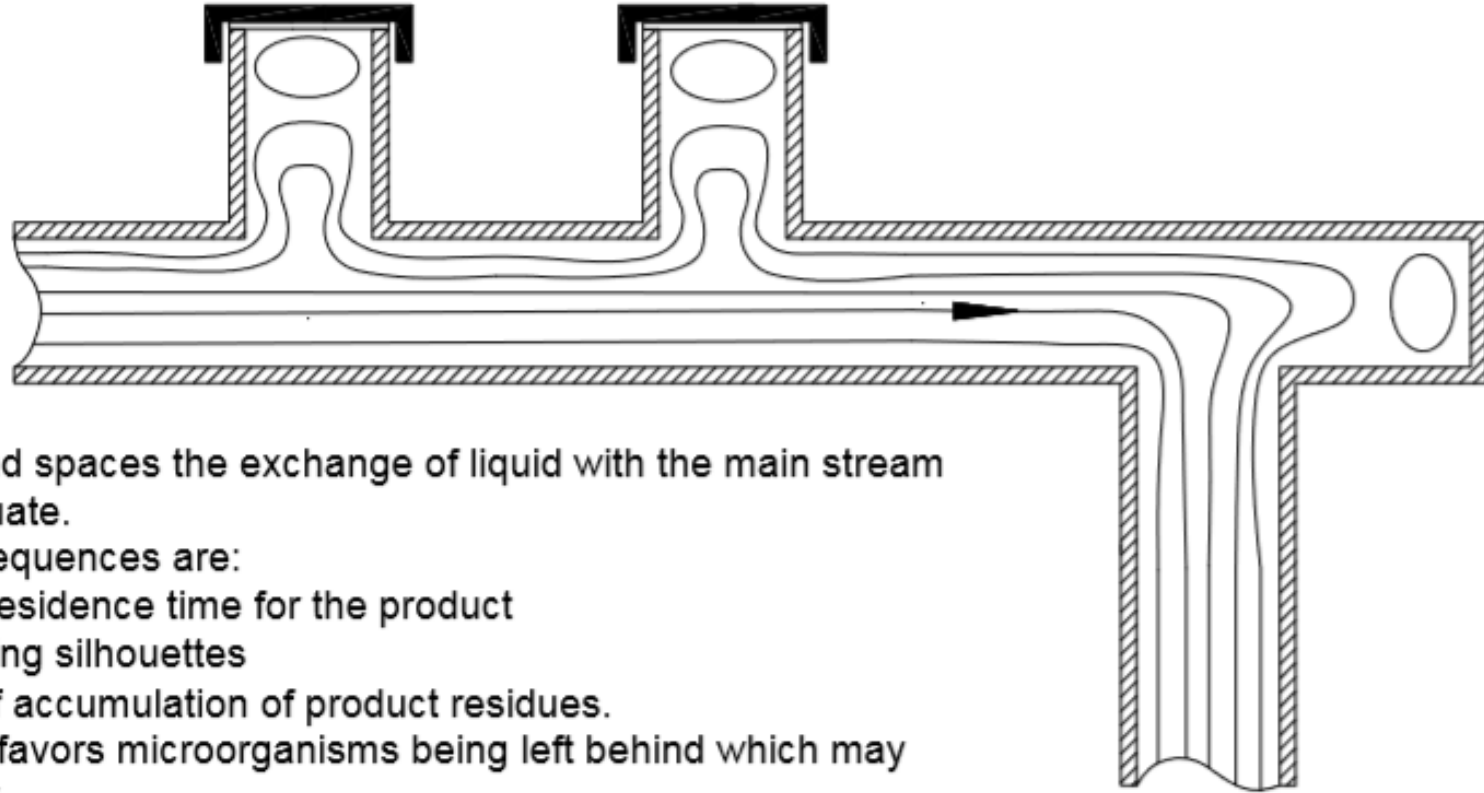
Transitions of inherently correct shape form an undrainable water pocket due to incorrect installation position.

3.5 Case study: “Dead lengths of pipe”



Lengths of product line which, for example, are brought into operation only during a cleaning phase fill up with product on starting up again under sterile conditions and this remains enclosed there for relatively long periods of time.

3.8 Case study: “Dead spaces”



Problem:

In the dead spaces the exchange of liquid with the main stream is inadequate.

The consequences are:

- long residence time for the product
- cleaning silhouettes
- risk of accumulation of product residues.

All of this favors microorganisms being left behind which may grow later.

アセプティックライン全体検証

- 中身の滅菌、包材の滅菌、機器の滅菌 すべてがそろって初めて無菌性が達成される…つまり最終製品の形態でしか 総合的な検証ができないことが多い
- 製造開始前には 何万パックかの 液体培地充填後の温度虐待試験、または 製品が微生物汚染を反映しやすいものであれば 製品そのもの
- 製造開始後は 製品サンプルの温度虐待試験、定期的な培地充填と温度虐待試験(バイオフィルムの定着防止)
- そのためバリデーションにかかる期間が長くなる

高酸性 vs 低酸性：殺菌特性の大きな分岐点

高酸性食品 (pH < 4.6)

ボツリヌス菌の増殖リスクがなく殺菌要件は比較的緩やかです。厳密な密封性管理は必須ですが、低酸性ほどの厳格さは求められません。

低酸性食品 (pH > 4.6)

ボツリヌス菌の増殖と毒素産生リスクが高く、製品に対しても包材に対しても極めて厳しい殺菌が必要です。容器の密封性維持にも多大な注意が必要です。

低酸性食品における密封性の重要性

低酸性アセプティック製品では、容器の密封性が破れ外部から空気や水が侵入した場合、せっかく殺菌した製品が再度危険な菌に汚染されます。

侵入による再汚染リスク

外気・水の侵入により、危険な菌が製品に再混入します。

栄養分が豊富な環境

低酸性食品は侵入菌の増殖を支援する栄養分に富んでいるため、特に危険です。

密封性の継続的管理

製造から流通・保管に至るまで、容器の密封性を維持し続けることが不可欠です。

熱殺菌の基本：pH と水分活性

殺菌価の決定要因

対象物のpHと水分活性（ A_w ）によって、要求される殺菌価の種類と水準が異なります。これらの物性値が微生物の生存・増殖環境を左右します。

食品衛生法の範囲

食品衛生法が要求する殺菌価は食中毒菌を対象としており、それよりも強い耐熱性を持つ変敗菌は含まれていません。変敗菌への対応は別途検討が必要です。



アセプティックバリデーションの全体像

01

熱殺菌の基本

pH・水分活性と殺菌価の関係、食品衛生法の要求水準

03

バリデーションの種類と手法

菌の耐熱性検証、熱殺菌バリデーションの各種アプローチ

02

食品安全危害要因の分類

重篤度に応じたバリデーション水準、高酸性・低酸性の特徴

04

バリデーションを覆す要因

耐熱性の分化、バイオフィルム、毒素汚染リスク

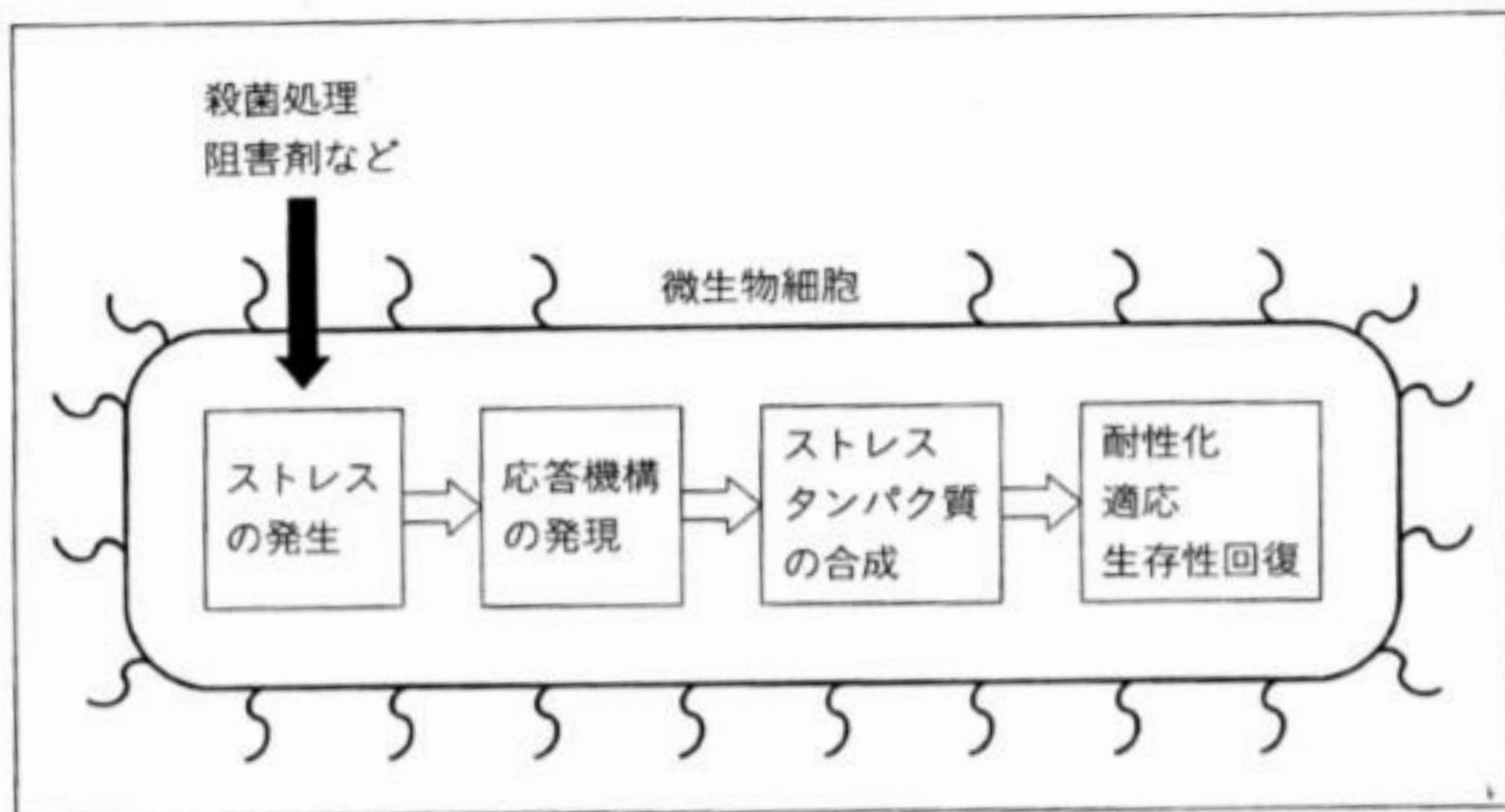
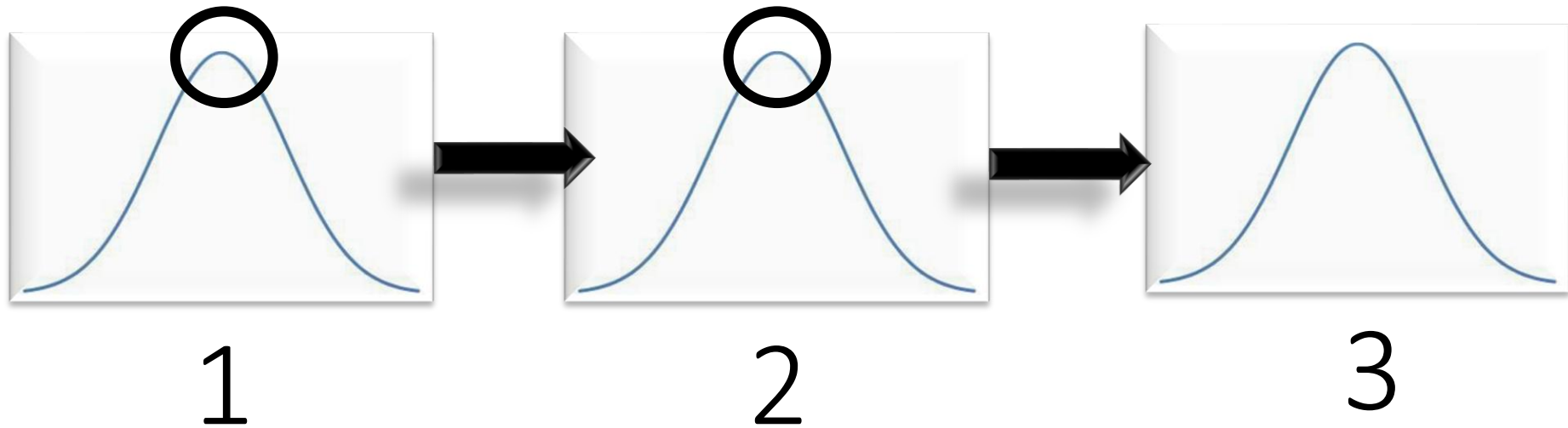


図 I - 8 微生物制御手段による細胞応答のプロセス

継体培養を繰り返しても 形質はどんどん分化していく





食品安全危害要因：重篤度とバリ デーション水準

発現しうる危害要因の重篤度に応じて、バリデーションに求められる水準が変わります。ボツリヌス菌のような致死性危害要因を含む低酸性食品では、最も厳格なバリデーションが必要です。

高酸性食品の危害要因の特徴



ボツリヌス菌リスク皆無

pH4.6未満では、ボツリヌス菌の増殖・毒素産生が抑制されます。



酸耐性菌への注意

酵母・カビ・乳酸菌など酸性環境でも生存できる変敗菌への対応が必要です。



比較的緩やかな殺菌条件

低酸性食品ほどの高温・長時間処理は不要ですが、変敗防止の殺菌は必須です。

低酸性食品の危害要因の特徴



ボツリヌス菌

増殖と毒素産生が最大の脅威。致死的な食中毒を引き起こします。



芽胞形成菌

高い耐熱性を持つ芽胞は通常の殺菌条件では死滅しにくく、製品安全を脅かします。



毒素産生型菌

菌が産生した毒素はレトルト工程でも分解されず、最終製品を汚染する危険があります。

菌自体の耐熱性バリデーション

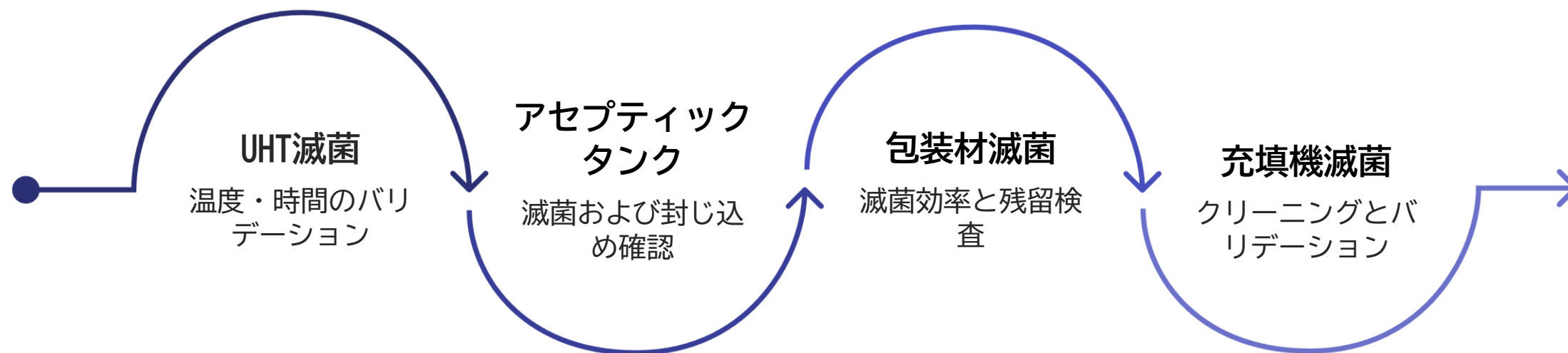
D値・Z値の測定

対象菌の耐熱性を定量化するD値（特定温度での90%死滅時間）とZ値（D値が10倍変化する温度差）を実験的に求め、殺菌条件設計の根拠とします。

バリデーションの手順

- ・ 対象菌株の選定（最も耐熱性の高い株）
- ・ 培地・実食品での耐熱性試験
- ・ D値・Z値の算出と文献値との比較
- ・ 必要殺菌価（F値）の設定
- ・ **または信頼できる文献検索**

アセプティック製品の各構成要素バリデーション（短期）



各構成要素はそれぞれ独立したバリデーションを必要とします。UHTから充填機まで、すべての工程で無菌性が確保されなければ、最終製品の安全は保証できません。

Hydrogen Peroxide

for packaging materials.

kaging system of Tetra Pak used H_2O_2

ation of 30 -35 % followed by hot air at

熱以外の殺菌手段：薬剤バリデー ション

アセプティック製品では、熱殺菌だけでなく包材内面や充填機については薬剤（過酸化水素等）による殺菌効果の検証が求められます。薬剤濃度・接触時間・温度条件を組み合わせた総合的なバリデーションが必要です。

「というのは簡単だが「接触時間が短い」「表面温度で殺菌効果の出方が異なる」
「薬剤温度で殺菌効果で出方が異なる」プラス「バイオフィルム保護効果が顕著にでる」

バリデーションを覆す要因①：耐熱性の分化

微生物の耐熱性分化とは

同一菌種であっても、環境条件（温度・pH・栄養状態）によって耐熱性が大きく変化します。実験室株と実際の製造環境で分離された株では、耐熱性が異なる場合があります。

バリデーションへの影響

既存のD値・Z値データが実際の製造環境の菌株に適用できない可能性があります。定期的な菌株の耐熱性再評価と、より保守的な安全マージンの設定が重要です。

熱殺菌バリデーションの種類

1

プロセスバリデーション

設定した殺菌条件（温度・時間）が製品全体に均一に適用されることを確認します。

2

チャレンジテスト

対象菌を意図的に接種し、設定条件での死滅効果を実証します。

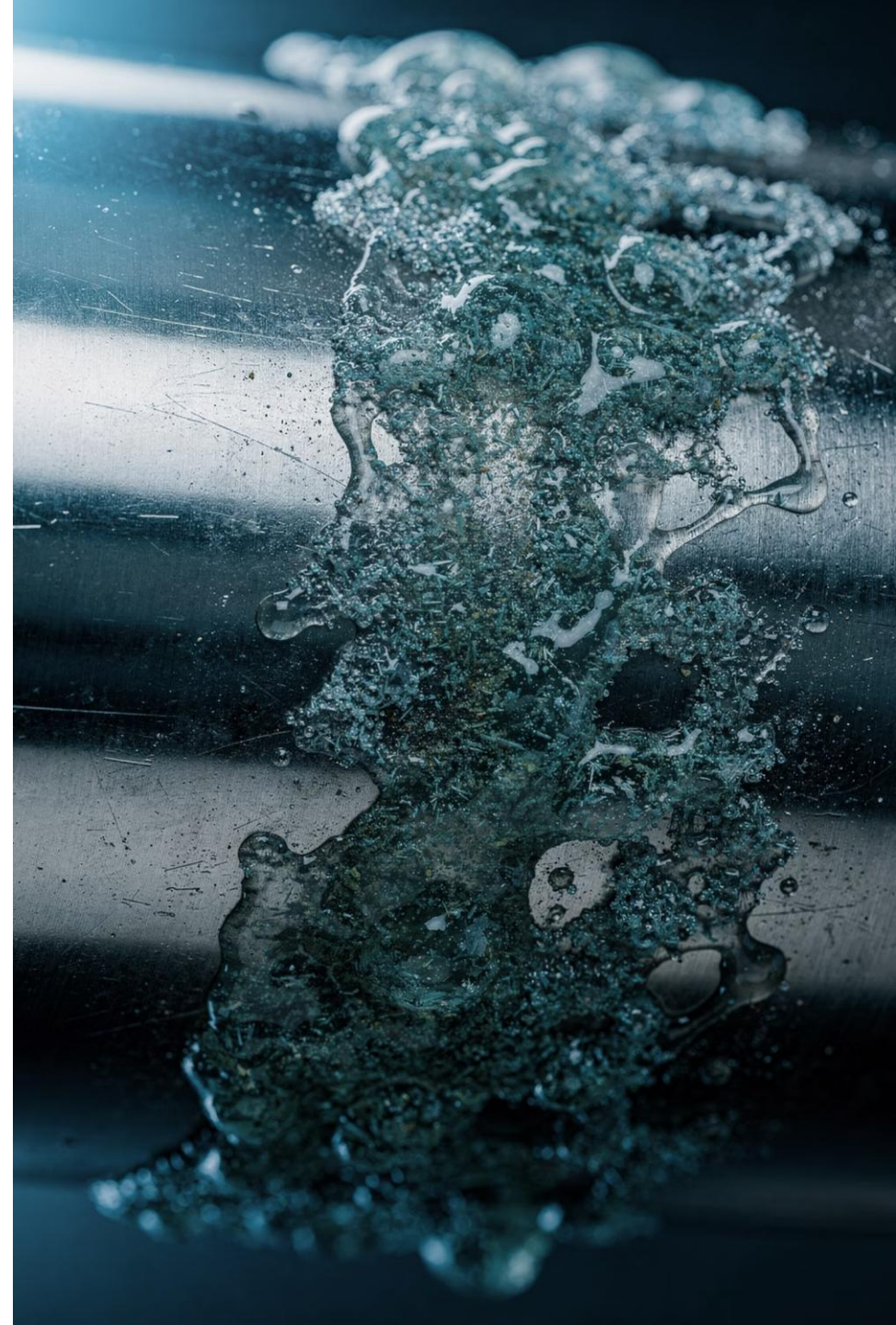
3

定期的な再バリデーション

設備の経年変化・原料変更・工程変更に伴い、定期的な再検証が必要です。

バリデーションを覆す要因②：バイオフィルム

低酸性アセプティック食品の製造工程では、途中の工程で芽胞菌によるバイオフィルムが生じやすく、ラインの殺菌を著しく困難にします。バイオフィルム内の菌は通常の殺菌条件に対して高い抵抗性を示します。



バイオフィルムがもたらす複合リスク

1

バイオフィルム形成

芽胞菌がラインに定着し、通常殺菌では除去困難な集落を形成します。

2

製品への芽胞混入

バイオフィルムから剥離した芽胞が製品に混入し、熱殺菌を困難にします。

3

毒素による最終汚染

毒素産生型芽胞菌が産生した毒素はレトルト工程でも分解されず、最終製品を汚染します。

バイオフィルム (biofilm) これまでの微生物細胞の耐性度合は研究室で使用する培地で培養した浮遊細胞を用いて検証している。しかしながら、実際に微生物が生育している環境を観察すると細胞が単独で生育している場合は比較的少なく、固形物表面に付着して集団を形成していることが多い。このような集団をバイオフィルムと呼ぶ。バイオフィルムでは、微生物細胞のみが密接に接着しているのではなく、菌体外多糖や核酸、タンパク質なども絡み合ったネットワーク構造を形成し、細胞単独で存在している浮遊細胞に比べて環境ストレスや抗生物質に対して耐性が非常に高いことが知られている¹⁰⁾。

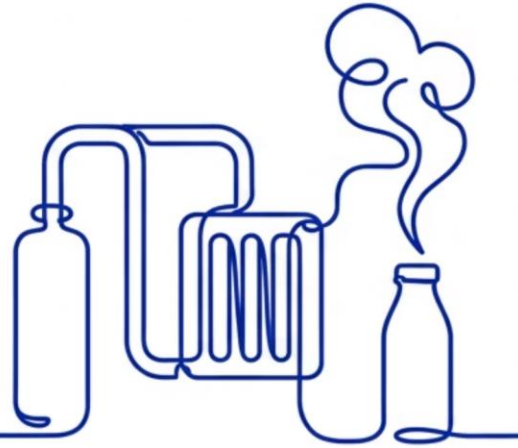
毒素汚染：見落とされがちな最大のリスク

- ⊗ 毒素産生型の芽胞菌が途中ラインで産生した毒素は、UHT（加熱処理）では分解されず、最終製品を汚染する可能性があります。菌を殺滅しても毒素は残存します。

これは通常の熱殺菌バリデーションの枠組みでは捉えきれないリスクです。製造ライン全体の衛生管理と定期的な微生物モニタリングによって、毒素産生菌の混入を未然に防ぐことが不可欠です。

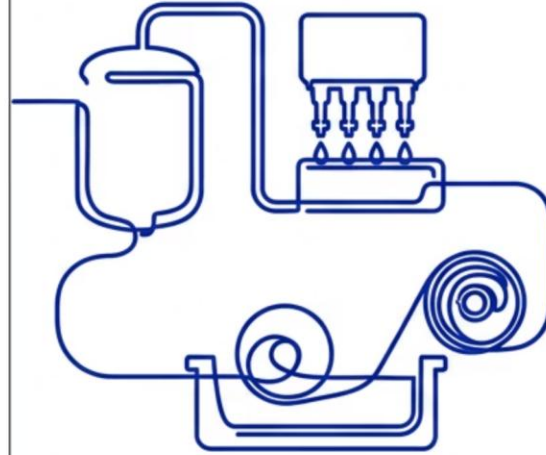
アセプティック製品バリデーシヨンの全体構造

製品の滅菌



- UHTバリデーシヨ
- F値の設定
- D/Z値の測定

設備の滅菌



- アセプティックタンク
- 充填機
- 包装材料滅菌機

バリデーシヨンを無効化するリスク要因



- 耐熱性の分化
- バイオフィルムの形成
- 毒素汚染

高酸性 vs 低酸性：バリデーション要件の比較

| 項目 | 高酸性 (pH<4.6) | 低酸性 (pH>4.6) |
|------------|--------------|--------------|
| ボツリヌス菌リスク | 無い | 非常に高い |
| 要求殺菌水準 | 比較的緩やか | 極めて厳格 |
| 密封性管理 | 重要 | 最重要 |
| バイオフィルムリスク | 低い | 高い |
| 毒素残存リスク | 低い | 高い |
| 変敗菌対応 | 必要 | 必要 |



まとめ：アセプティック熱殺菌バリデーシヨンの要点

pH・Awが基本

製品特性に応じた殺菌価の設定が出発点です。

多要素バリデーシヨ

UHT・タンク・包材・充填機、各要素の独立した検証が必要です。

熱＋薬剤の複合検証

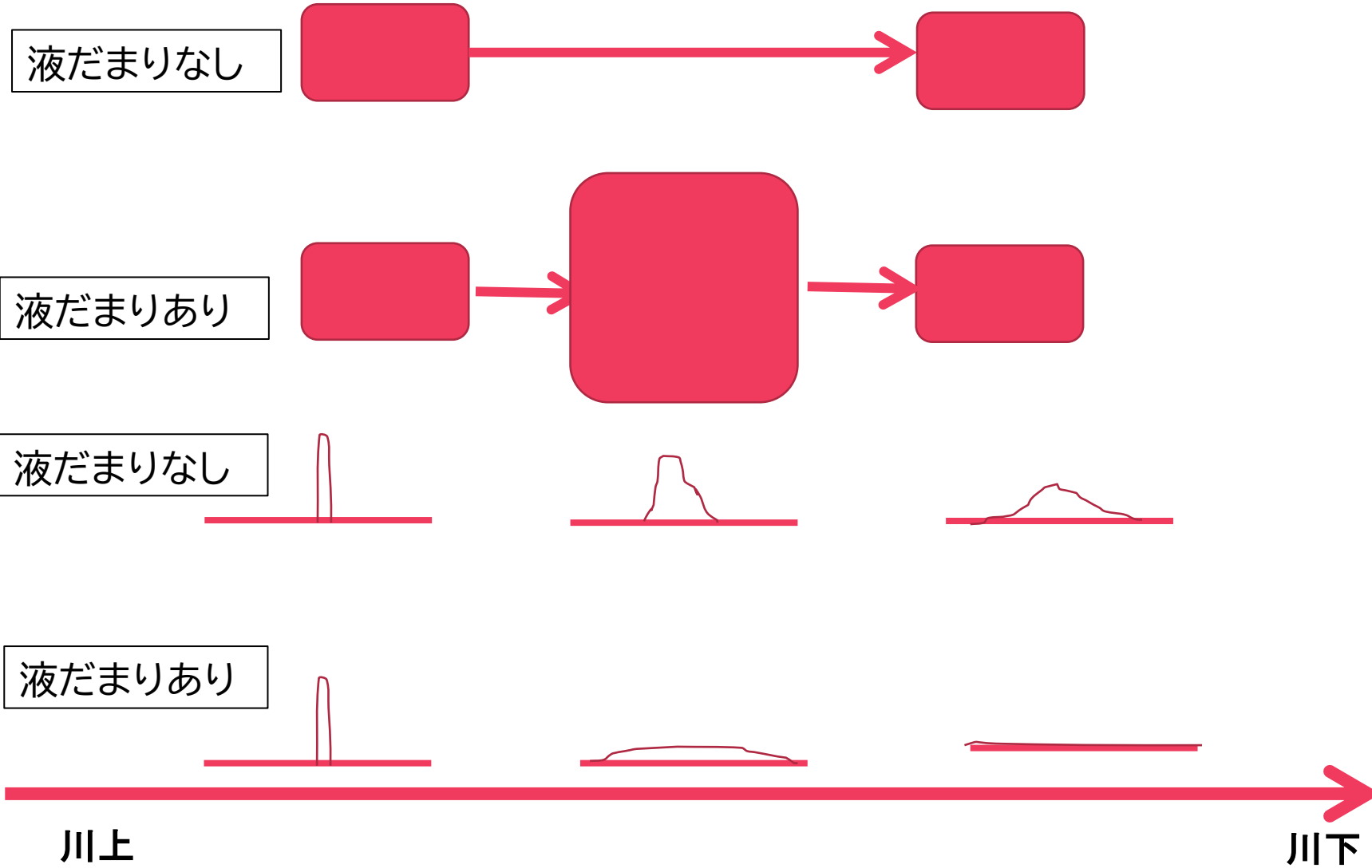
包材・充填機は薬剤殺菌効果の検証も不可欠です。

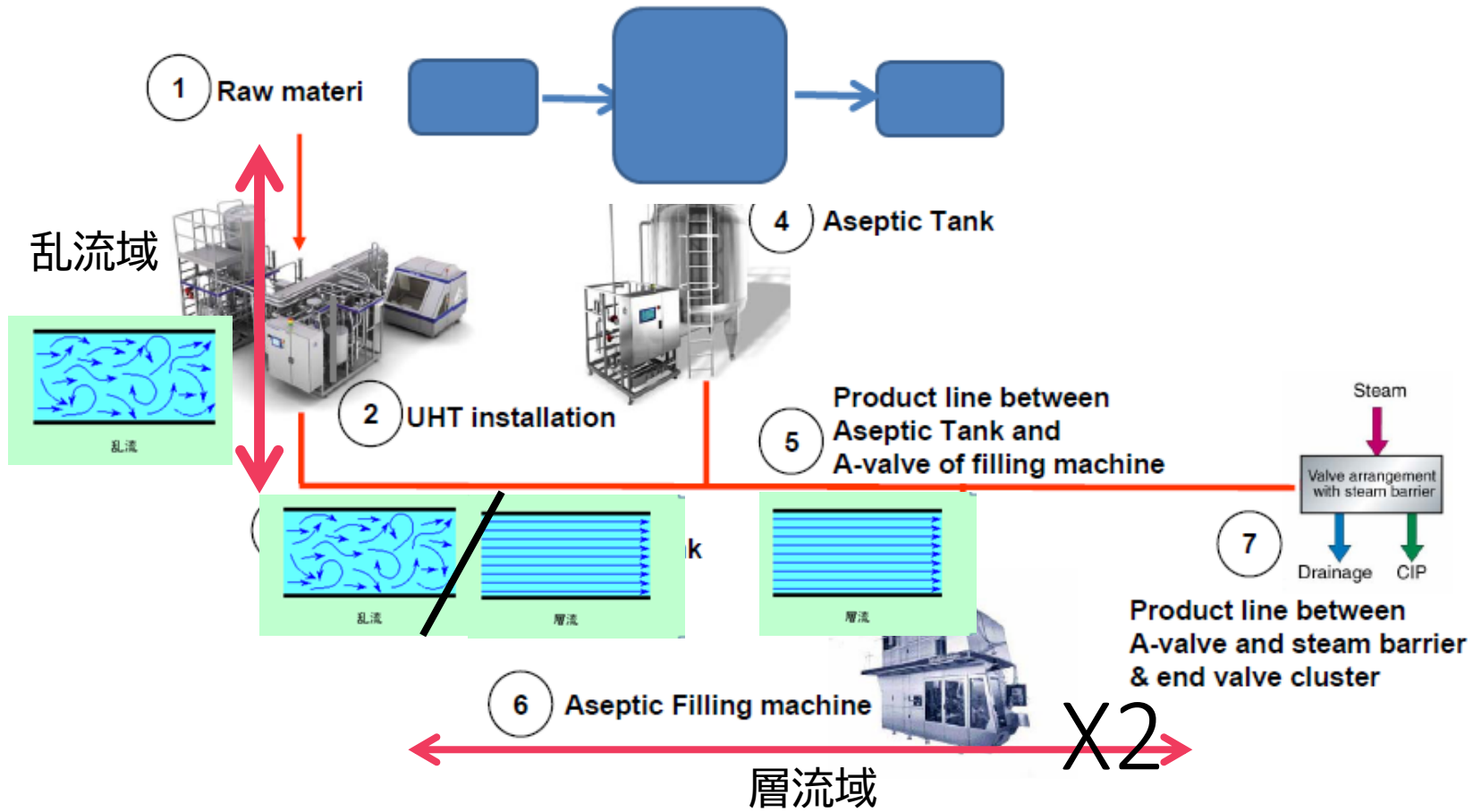
バイオフィルム・毒素に注意

バリデーシヨンを覆す要因への継続的な監視が安全の鍵です。

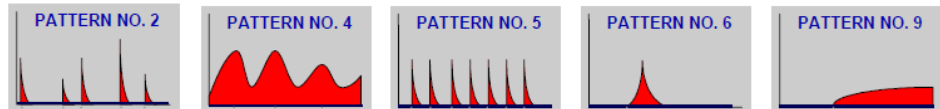
他の分野のバリデーシヨンに比べて期間が長くなりがちです

途中で液だまり:アセプティックタンク、ホモ





すくなくとも アセプティックタンク以降で
 かなり 高濃度の汚染でない
 下のような きれいなパターンは起きづらい



アセプティックのバリデーション実例

一番進んでいるPETボトルライン

Aseptic Processing and Packaging for the Food Industry

[f Share](#) [t Tweet](#) [in LinkedIn](#) [✉ Email](#) [🖨 Print](#)

Parent Section N/A

Updated: 2005-07-14

Content current as of:
11/11/2014

GUIDE¹ TO INSPECTIONS OF ASEPTIC PROCESSING AND PACKAGING FOR THE FOOD INDUSTRY

¹This document is reference materials for investigators and other FDA personnel. The document does not bind FDA, and does not confer any rights, privileges, benefits, or immunities for or on any person(s).

This document is also available in

 [PDF format \(1,144KB\)](#)

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

INSPECTION

Process Flow Chart

Scheduled Process

PROCESSING

Product Heating Systems

EQUIPMENT AND CONTROLS

Raw Material and Formulations

Timing or Metering Pump

Sterilizer

OPERATION

Start-up

Records

Process Deviations

Clean-up and Re-Sterilization After Process Deviation

Package Sterilization Systems

CONTAINER STERILIZING, FILLING AND CLOSING OPERATIONS

METAL CONTAINERS AND CLOSURES

Equipment and Controls

Operation

Process Deviations

PAPERBOARD OR PLASTIC CONTAINERS

Equipment and Controls

Operation

THERMOFORM-FILLED-SEAL CONTAINERS-PRE-STERILIZED BY HEAT OR CO-EXTRUSION

Equipment and Controls

Processing

Operation

Process Deviations

BAG IN BOX PACKAGE SYSTEMS

Equipment and Controls

RECORDS

CONTAINER CLOSURE EVALUATION

POST PROCESS HANDLING

TRAINING

MAINTENANCE

SAMPLE COLLECTION

TABLE 1: ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF HEATING SYSTEMS

FIGURES

Figure # 1: Steam Injection

Figure # 2: Steam Infusion

Figure # 3: Product-to-Product

Figure # 4: Tubular Heat Exchanger

Figure # 5: Scraped Surface Heat Exchanger

Figure # 6: Superheated Steam Metal Container System

Figure # 7: Webfed Paperboard System I

Figure # 8: Webfed Paperboard System II

Figure # 9: Preformed Cup System.....pg. # 20

Figure #10: Thermoform-Fill-Seal System

Figure #11: Aseptic System

1. Coordinating aseptic food processing operations

Aseptic processing and packaging consist of several operations that need to work safely concurrently, and any misstep can end in an unsafe product. Every part of the system—from the utilities, ingredient dosing, batching and mixing, to the control and data recorder—must be fit for purpose and perform as designed at all times. It is necessary to have a plan to validate, verify and control maintenance and changes made to each of these units to ensure the safety of the products.

2. Filing with the FDA

Each product must be filed with the FDA. The [filing documents](#) must contain these components:

- The [thermal process](#),
- equipment sterilization and maintenance of sterility,
- filling and packaging machine [validation](#)
- and final product, which has been validated using a combination of microbiological and physicochemical tests.

This follows a comprehensive food safety plan which includes very thorough record-keeping of the critical factors. Be sure you are monitoring and recording data from all your critical control points (CCPs). There are typically five in aseptic processing, which we covered in the previous post.

3. Testing your aseptic food process for quality assurance

While products made under the filed conditions are in principle safe, it is normal practice to test a few samples for positive release; the sampling program has to be agreed upon beforehand. Typically, a few samples are incubated in a hot box for seven to fifteen days to make sure there are no off-orders or observable package bloating. Even though the aseptic processes are validated, it is a good idea to have the in-house microbiology lab perform aerobic plate count (APC) and yeast/mold tests to rapidly detect defects in post-processing and package closures. If your product is low acid, then the QA tests should include mesophilic and thermophilic anaerobic spores, which are the hardest to eliminate and the ones that have the potential to produce *Clostridium botulinum*.

<https://www.crbgroup.com/insights/product-safety-aseptic-food-processing>



Welcome to the Website of
the Association of the
Beverage Machinery
Industry

At present, the Association counts a total of 11 member companies which are listed below.

Associated companies:

- AETNA Group S.P.A.
- CFT S.P.A.
- Gassner GmbH
- GEA Procomac S.P.A.
- GEA VIPOLL d.o.o.
- KOSME S.r.l.
- Krones AG
- SACMI FILLING S.P.A.
- Serac Group
- Sidel Group
- SIPA S.P.A.

Common Aseptic Validation Protocol



Table of Contents

1. Preface
2. Plant Prerequisites
3. Validation Format
4. Low Acid Versus High Acid Products
5. Validation Medium
6. Thermal Treatment of the Product
7. Sample Size
8. Validation Sequence
9. Fill Level of the Bottles
10. Incubation Time and Temperature
11. Storage Conditions
 - a) for Low Acid Products
 - b) for High Acid Products
12. Inspection
13. Evaluation
14. Acceptance Criterion
15. Acceptance Steps

4. Low Acid Versus High Acid Products

- This guideline distinguishes between procedures for low acid products and high acid products (according to the FDA definition).
- Low acid products : $\text{pH} > 4.6$
- High acid products : $\text{pH} \leq 4.6$
- If a low acid validation is passed, the line is also validated for high acid products, if all parameters of the aseptic block remain the same.

5. Validation Medium

- If the intention is to sell the tested production volume once the aseptic system has been validated, the intrinsic quality of the product must follow the customer's specifications.
- For the microbiological validation of low acid aseptic lines, a culture medium is used to enable visual inspection. Alternatively, the customer's product may be used, e.g. UHT milk or others.
- For the microbiological validation of high acid aseptic lines, a clear product (e.g. apple juice) is used to enable visual inspection.

6. Thermal Treatment of the Product

- As heat treatment for high acid products is not sufficient for killing all kinds of microorganisms, including heat resistant spores, the temperature/time regime affects the final results of the validation. It is recommended to apply the highest temperature and longest holding time the process unit allows for in order to minimize this influence. For heat treatment explanation, see appendix 3.
- It is recommended to detect thermophilic spore formers in the raw product just before the heat treatment as well as in the aseptic storage tank and in the filled bottles.

7. Sample Size

The validation is based on three runs of the dedicated numbers of bottles and product.

| Low acid products ³ | High acid products |
|--------------------------------|------------------------|
| 3 times 10,000 bottles | 3 times 30,000 bottles |

8. Validation Sequence

Three consecutive days are chosen to run the tests according to the following sequence:

| 1 st day | 2 nd day | 3 rd day |
|---|---|---|
| CIP/COP SIP/SOP Run dedicated number of bottles CIP/COP | SIP/SOP Run dedicated number of bottles CIP/COP | SIP/SOP Run dedicated number of bottles CIP/COP |

For definitions of CIP/COP/SIP/SOP, see appendix 3

9. Fill Level of the Bottles

- Half fill the bottles in order to shorten the incubation time because of a higher oxygen level in the headspace.
- If bottle handling (transport, stacking) is critical, the fill level may be increased up to the necessary value, e.g., 80% of the nominal volume.
- If nitrogen is used in commercial production, the validation should also include nitrogen dosing.
- If the customer wants to have sellable product, the bottles may be filled with product up to the nominal volume.

10. Incubation Time and Temperature

| Product \ Fill level | Half filled bottles with or without liquid nitrogen | 80 % filled bottles with or without liquid nitrogen | Completely filled bottles without liquid nitrogen | Completely filled bottles with liquid nitrogen |
|----------------------|---|---|---|--|
| Low acid | 7 days of incubation @ 30-32° C | 7 days of incubation @ 30-32° C | 7 days of incubation @ 30-32° C | 7 days of incubation @ 30-32° C |
| High acid | 14 days of incubation @ 25-30° C | 14 days of incubation @ 25-30° C | 14 days of incubation @ 25-30° C | 21 days of incubation @ 25-30° C |

11. Storage Conditions (for Low Acid Products)

a) For low acid products

- In case of culture medium or clear product in clear bottles, all 30,000 bottles are visually inspected after 7 days of incubation at a temperature of 30° –32° C.
- In case of turbid product in clear bottles, all 30,000 bottles are visually inspected after 7 days of incubation at a temperature of 30° –32° C. Additionally 1,000 bottles per run are checked for pH.
- In case of non-transparent bottles, 30,000 bottles are visually inspected after 7 days of incubation at a temperature of 30° –32° C. Defective bottles change their size or their shape (gas production or vacuum generation). Additionally 3,000 bottles per run are checked for pH level.

11. Storage Conditions (for High Acid Products)

b) For high acid products

- Half filled or completely filled bottles are stacked on pallets and stored in a secured place at constant temperature of 25 to 30° C for 14 days. All 90,000 bottles are visually inspected.
- Half filled bottles with liquid nitrogen treatment are stored at constant temperature of 25 to 30° C for 14 days. All 90,000 bottles are visually inspected.
- Completely filled bottles with liquid nitrogen treatment are stored at constant temperature of 25 to 30° C for 21 days. All 90,000 bottles are visually inspected.

12. Inspection

- After storage, all the bottles are visually inspected.
- Only hermetically sealed packages are taken into consideration where the integrity has been assured during all the production steps.

13. Evaluation

- All packages failing microbiological testing are to be saved for package integrity testing.
- If a contaminated bottle is found, microbiological identification is carried out in order to determine the origin of the contamination. Especially heat resistant spore identification must be carried out in order to exclude microorganisms coming from the raw material that may have survived thermal processing.

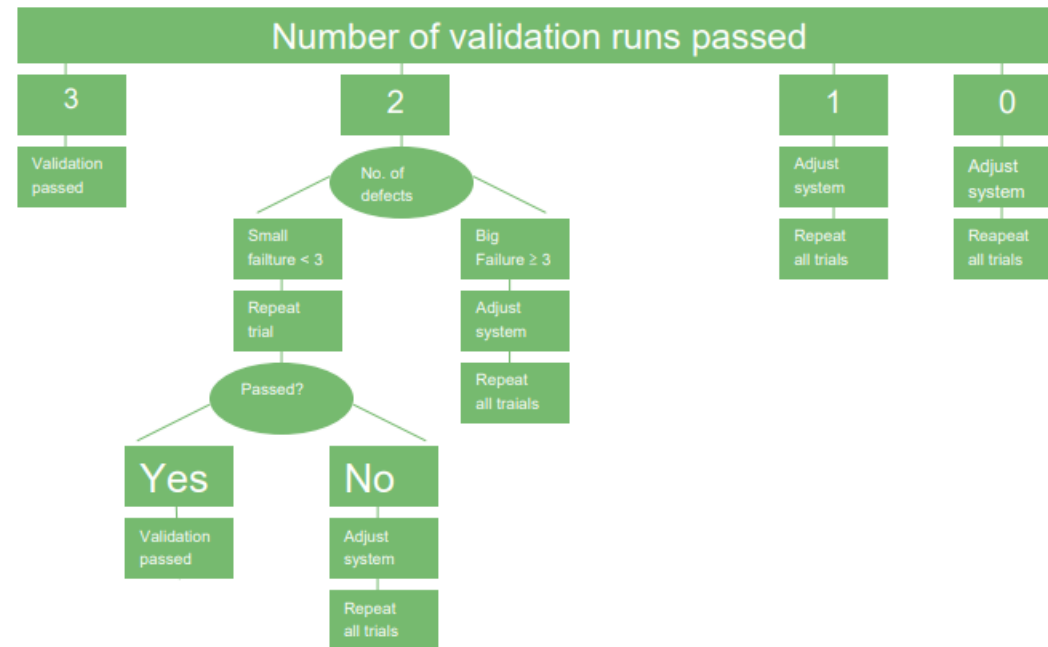
14. Acceptance Criterion

Acceptance Criterion

- The test is accepted if not more than one defective bottle per run is identified.
- Statistically, zero is not defined. This is the reason why zero defects out of a certain amount of bottles can not be proven.

Common Aseptic Validation Protocol

15. Acceptance Steps



Appendix 2: Initial Bioburden of Packaging Material

Microbiologic raw packaging material evaluation:

Before using packaging materials such as preforms, caps or bottles, the initial bioburden will be evaluated. This evaluation will be carried out on 10 units of the packaging material sampled in accordance with good laboratory practice. Preforms or caps will be placed in sterile vials filled with a sterile recovery liquid based on pure sterile water containing 1 ‰ of Tween 80.

Inside the bottles:

Fill 100 ml of the recovery agent in the bottle and close it with a sterile cap.

Complete bottles:

cut the bottles in different parts under aseptic conditions in order to be able to place the pieces in a sterile container. Then proceed as with caps or preforms. After shaking, the recovery liquid is filtered on a membrane that will be incubated on a Plate Count Agar for 5 days at 30° C. After incubation, the CFUs will be counted.

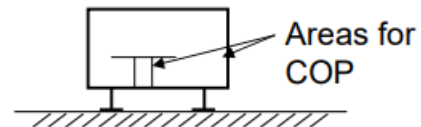
| Type of packaging material | Total CFUs | Total CFUs |
|----------------------------|--------------|--------------|
| Complete preforms | Average < 10 | Maximum: 50 |
| Complete caps | Average < 10 | Maximum: 50 |
| Inside bottle | Average < 10 | Maximum: 50 |
| Complete bottle | Average < 20 | Maximum: 100 |

Appendix 3: CIP/COP and SIP/SOP Definition

CIP = cleaning in place

CIP means automatic cleaning of internal parts of pipes, vessels, etc. by means of liquid products (e.g. appropriate chemicals)

COP means to us: cleaning of external surfaces inside an isolator by means of liquid products (appropriate chemicals)



C = Cleaning
S = Sterilization
I = Inside the pipes and vessels
O = Outside the pipes and vessels,
but still inside the aseptic chamber
P = Place

SIP = sterilization in place

SIP means automatic sterilization of internal parts of pipes, vessels etc. by means of appropriate methods

SOP = automatic sterilization of external surfaces inside an isolator by means of sterilants, disinfectants or other appropriate methods

Appendix 4: Integrity Test Packaging Material

Procedure using electrical conductivity

The packaging tightness test is performed to detect potential leaks on bottles closed with caps or aluminium foils by means of measurement of electrical resistance.

Equipment, instruments and reagents used



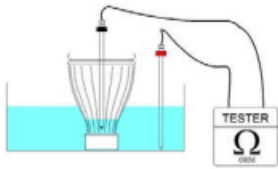
- City water with a measurable conductivity
- Tester for measuring the resistance. The apparatus must reach 2000 M Ω .

Prerequisites

- Define the quantity of bottles required for performing the test (at least 100).
- Define the cap application torque using a specific dynamometer.
- Each bottle must be cut without damaging the closure.

Appendix 4: Integrity Test Packaging Material

Procedure

| | |
|---|---|
| <p>Each bottle must be cut and soaked in standard city water.</p> |  |
| <p>Fill each bottle with approximately 100 ml of the same standard city water.</p> |  |
| <p>Use a tester, set the resistance measurement modality to 2000 MΩ and insert one of the electrodes into the bottle in contact with the city water and the other one into the bath outside of the bottle.</p> <p>Since the two environments - the one inside and the one outside the bottle - are separated, the tester shows an infinite resistance called "not readable/out of range".</p> <p>The first measurement must be carried out 10 minutes after start. The bottles remain in the bath for 72 hours. During this period, some measurements are performed before the bottles are removed.</p> |  |
| <p>If the tester shows a readable value, there is a connection between the inside and the outside of the bottle. This is considered an untight package.</p> | <p>No leak is accepted in this trial of 100 bottles</p> |

Appendix 5: Inoculation Methods for Packaging Material

Preparation of spore suspension

Inoculation methods for packaging material need to be carried out professionally in order to achieve indisputable results.

General considerations regarding spores

- Bacteria or mould spores should come from a germ which is listed in an official type culture collection and commercially available.
- Different, independent spore suspensions suppliers should be available.
- The spores need to be prepared in a water suspension free from salts and organic material that could provide a residue during drying.
- Spore dilutions need to be prepared in pure sterile water. No Ringer's solution may be used.
- Mould spores need to be free from organic cultivation material. Normally, the spore suspensions are washed 3 to 4 times and centrifuged in order to remove any kind of foreign matter.

Appendix 5: Inoculation Methods for Packaging Material

There are three different methods for the inoculation of the packaging material:

Single-dot inoculation:

The dot has a volume of 10 μl and is placed on the surface of the material to be tested with a micropipette. When starting from a defined concentrated spore suspension (e.g. 10^8 spores/ml), dilutions will be prepared in order to obtain the final correct concentration level of spores. The inoculation area will be marked with a circle.

Multi-dot inoculation:

The dots will have a total volume of 10 μl and are placed on the surface of the material to be tested with a micropipette. When starting from a defined concentrated spore suspension (e.g., 10^8 spores/ml), dilutions will be prepared in order to obtain the final correct concentration level of spores. The sum of the individual dots concentration will be equal to the concentration level that is required. If the final level is 10,000 spores and 10 dots are placed on the material, each dot will have an amount of 1,000 spores. The inoculation area will be marked with circles.

Spray inoculation:

A sprayer that delivers a constant volume and a homogeneous fine film will be used to inoculate the inside of the packaging material. The difficulty is the homogenous distribution of the inoculant. Operator training is required.

Appendix 6: Test Spores

- Spores of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 are recommended for PAA and H₂O₂ systems. More used for low acid products and surface decontamination trials.
- Spores of *Aspergillus niger* ATCC 16404 are recommended for PAA, H₂O₂ and UV-light systems. Mostly used as the mould reference in the industry. More dedicated for high acid products.

TAKE HOME MESSAGE



アセプティックのバリデーション

- 短期でも 中身・包材・アセプティックタンク・充填機の「全方位外交」
- 芽胞菌のLong Tailが出やすい
- 対象菌によって、中身の特性によって、包材特性によってプロトコルが七変化
- バイオフィルムの問題まで入れるとバリデーションの期間は長くなりがち

TAKE HOME MESSAGE



アセプティックのバリデーション

- すでに完璧なプロトコルが出来上がっていると称するメーカーの言いなりにならないように（潜在不良率が200PPMあるのにたかが数万個の充填トライアル→不良発現の不明な短期温蔵虐待試験で何がわかるというのか？）
- すべてに疑いの目を。あくまで自分で納得できるプロトコルを
確立

TAKE HOME MESSAGE



全体を通して

- 熱だけではない。もっと重要な因子が隠れていることが多い
- 工程に住み着いている菌の耐（熱・薬剤）性獲得
- 長期使用ののち初めて出てくる不良にも最初から目を光らせる
（CIP不良、機器表面・溶接ラインの劣化、ガスケットの劣化）
そして バイオフィルム生成



Since 2016

食品安全の守護神

<http://qpfs.or.jp>

いつでも相談を
info@qpfs.or.jp